

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
des Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin

(Leiter: Prof. Dr. med. Rolf Schröder)

DER RADIOLIGANDEN-REZEPTOR-ASSAY FÜR SCHILDDRÜSENSTIMULIERENDE FAKTOREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Gerhard Kruck aus Neuenstein
und
Irmtraut Kruck, geborene Lang, aus Schwäbisch Hall

1978
—

Aus der Medizinische Klinik und Poliklinik
des Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
(Leiter: Prof. Dr. med. Rolf Schröder)

Der Radioliganden-Rezeptor-Assay für
schilddrüsenstimulierende Faktoren

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt

von

Gerhard Kruck

aus

Neuenstein

und

Irmtraut Kruck

geborene Lang

aus

Schwäbisch Hall

Referent: Prof. Dr. med. H. Schleusener
Prof. Dr. med. P. Freyschmidt

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin



Promoviert am: 27. September 1978

Vorwort bei einer Gemeinschaftsarbeit:

Da die gegenwärtige Promotionsordnung fordert, daß aus einer solchen Gemeinschaftsarbeit Einzelleistungen ersichtlich sein müssen, haben wir die Arbeit wie folgt aufgeteilt:

I. Einleitung: Gerhard Kruck und Irmtraut Kruck

II. Methodik und Resultate:

- 1) Allgemeine Versuchsbedingungen:
überwiegend Irmtraut Kruck
- 2) Unspezifische Einflüsse des Inkubations-
mediums: überwiegend Gerhard Kruck
- 3) Die präparative Aufarbeitung der Membranen:
überwiegend Irmtraut Kruck
- 4) Die radioaktive Markierung von TSH:
überwiegend Gerhard Kruck

III. Diskussion: Gerhard Kruck und Irmtraut Kruck

INHALTSVERZEICHNIS	<u>Seite</u>
1. <u>Einleitung</u>	8
2. <u>Methodik</u>	12
2.1. Aufarbeitung von TSH-bindenden Schilddrüsen- membranen	12
2.1.1. Angereicherte Membranen (nach Mehdi und Nussey)	12
2.1.2. Fraktionierte Zentrifugation des Schilddrüsenhomogenisats	13
2.1.3. Membranen vom 700 - 25.000 x g-Sediment	13
2.2. Radioaktive Markierung von TSH (nach Hunter und Greenwood)	14
2.3. Rechromatographie von ^{125}J -TSH	14
2.4. Nachreinigung des markierten TSH (Smith und Hall)	15
2.4.1. Aufbereitung von Bindungs-Membranen für die Nachreinigung von ^{125}J -TSH	15
2.4.2. Reinigung des ^{125}J -TSH durch Bindung an Schilddrüsenmembranen	15
2.5. Aufarbeitung von Immunglobulinen durch Fällung mit Ammoniumsulfat	16
2.6. Standardkurve für Membran-Konzentrationen	17
2.7. Radioliganden-Rezeptoren-Assay	19
2.7.1. Bindung von ^{125}J -TSH an menschliche Schilddrüsenmembranen (Methode nach Mehdi)	19
2.7.2. Nachweis von HTSI im RRA (Methode nach Mehdi)	20
2.7.3. Der modifizierte RRA	21

	<u>Seite</u>
3. <u>Resultate</u>	22
3.1. TSH-Standardkurve	22
3.2. HTSI-Standardkurve	24
3.3. Einfluß der Inkubationszeit	26
3.3.1. auf den RRA nach Mehdi	26
3.3.2. auf den modifizierten RRA	28
3.4. Einfluß der Temperatur	30
3.5. Einfluß der Membrankonzentration	32
3.5.1. auf den RRA nach Mehdi	32
3.5.2. auf den modifizierten RRA	34
3.6. Einfluß der NaCl-Konzentration	36
3.7. Vergleich Serum-IgG und IgG mit Ammonium- sulfat präzipitiert	38
3.8. Einfluß der Proteinfractionen von Normal- serum	40
3.9. Standardkurven für die Serumprotein- fraktionen	42
3.10. Bindungsstudien mit den 700 x g, 10.000 x g, 25.000 x g und 100.000 x g Membranfraktionen	44
3.11. TSH-Standardkurven für verschiedene Membranfraktionen	46
3.12. Vergleich der TSH-Standardkurven: angereicherte Membranen und 700 - 25.000 x g Fraktion	48
3.13. Jodierung von TSH nach Hunter und Greenwood	50
3.14. Rechromatographie	52
3.15. Bindungsstudien mit ^{125}J -TSH chromatographiert mit Sephadex G-100 superfine	54
3.16. Nachreinigung nach der Absorptionsmethode nach Smith und Hall	56
3.17. Vergleich der Empfindlichkeit im RRA nach Mehdi und im modifiziertem RRA	58

4. <u>Diskussion</u>	60
5. <u>Zusammenfassung</u>	72
6. <u>Literaturverzeichnis</u>	74

Abkürzungen

ASP	= Ammoniumsulfatpräzipitat
cAMP	= 3'5'-cyclisches Adenosinmonophosphat
HTSI	= Human Thyroid Stimulating Immunoglobulin
IgG	= Immunglobulin G
LATS	= Long-Acting Thyroid Stimulator
PP	= Phosphatpuffer
PPB	= Phosphatpuffer mit Natriumbicarbonat
PPNB	= Phosphatpuffer mit Natriumchlorid und Natriumbicarbonat
RRA	= Radioliganden-Rezeptoren-Assay
RSA	= Rinder-Serum-Albumin
TSH	= Thyroid Stimulating Hormone

1. Einleitung

Das physiologische die Schilddrüse stimulierende Hormon ist das Thyreoidea-Stimulierende-Hormon (TSH). Es ist ein Glykoproteid mit einem Molekulargewicht von ca. 28.000, das im Hypophysenvorderlappen gebildet wird und dessen Konzentration im Blut durch den bekannten Regelkreis zwischen Hypophyse und Schilddrüse bestimmt wird (Pastan et al., 63). TSH stimuliert die in der Schilddrüsenmembran lokalisierte Adenylcyclase, mit einem daraus resultierenden Anstieg des intrazellulären 3'5'-cyclischen Adenosinmonophosphat (cyclisches AMP). Dieses stimuliert Stoffwechselvorgänge in der Zelle (Burke, 21; Schell-Frederick und Dumont, 72; Wolff und Jones, 82; Yamashita et al., 84).

1956 entdeckten Adams und Purves (1) im Serum von Patienten mit Morbus Basedow einen Faktor, der wie TSH die Fähigkeit besitzt, die ^{131}J -Sekretion der Schilddrüse von Meerschweinchen zu stimulieren. Dieser Faktor wurde Long-Acting Thyroid Stimulator (LATS) genannt. Er stimuliert im Vergleich zu TSH die Schilddrüsen von Meerschweinchen bzw. Mäusen verzögert und länger (Adams et al., 2; McKenzie et al., 42, 43). LATS konnte als Immunglobulin der Gruppe G identifiziert werden (Adams und Kennedy, 41; Kriss et al., 33, 35). Während Human-TSH-Antiserum die Stimulation der Mäuseschilddrüsen durch LATS nicht verhinderte (Adams et al., 3; McKenzie et al., 47), gelang es mit Human-IgG-Antiserum die LATS-Aktivität deutlich zu vermindern (Kriss et al., 33). Weiterführende Untersuchungen zeigten, daß LATS ein humoraler Antikörper zu einem in der Schilddrüsenzellmembran lokalisierten Antigen ist (Amino et al., 10; Chopra et al., 25; Kriss et al., 33; McKenzie und Gordon, 46; Mehdi et al., 52, 54; Miyai, 55; Wall et al., 79).

LATS stimuliert wie TSH das Adenylcyclase-cAMP-System (Bastomsky und McKenzie, 13; Burke, 21; Kaneko et al., 30; Kendall und Taylor, 31; Levey und Pastan, 38; Yamashita und Field, 84).

Die LATS-Aktivität ist im Gegensatz zur TSH-Aktivität unabhängig von der Schilddrüsenhormonkonzentration (Kriss et al., 34). LATS hat in vivo und in vitro im Vergleich zu TSH einen verzögerten Wirkungseintritt und eine längere Wirkdauer (Adams et al., 9; Arnaud et al., 11; Bitensky et al., 18; Brown et al., 19; Burke et al., 20, 22; McKenzie, 35, 36; McKenzie und Williamson, 39; Mehdi et al., 42; Shishiba et al., 65).

Bis 1974 wurde LATS mit Hilfe des McKenzie-Mäuse-Versuches ("bioassay") nachgewiesen (McKenzie und Williamson, 48). Dieser Versuch beruht auf der Stimulation der Schilddrüsenhormonsekretion durch Injektion von TSH bzw. LATS bei Mäusen. Der Anstieg des Hormonspiegels im Serum der Tiere ist abhängig von der Konzentration der stimulierenden Substanz (McKenzie et al., 48, 49).

Da LATS nur in wenigen Seren von Morbus Basedow-Patienten nachzuweisen war, suchte man dafür die Ursache zunächst in der Unempfindlichkeit des McKenzie-Versuches (Wong und Litman, 83). Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen ergaben Hinweise, daß neben LATS im McKenzie-Versuch auch noch andere thyreotrope Immunglobuline existieren. So fanden Adams und Kennedy (6, 7) einen Faktor, der die Neutralisation von LATS durch menschliches Schilddrüsenhomogenat verhindert, nicht aber die Neutralisation durch Mäuseschilddrüsenhomogenisat. Deshalb gaben sie ihm den Namen LATS-Protektor - ein ebenfalls der Gruppe G zugehöriges Immunglobulin. Dieser LATS-Protektor weist eine hohe Affinität zu menschlichem Schilddrüsen Gewebe auf, während er im McKenzie-Versuch nicht nachweisbar ist. Sie konnten ihn im Serum von 95 % ihrer Morbus Basedow-Patienten nachweisen (Adams und Kennedy, 8). Diese Ergebnisse wurden durch Kendall und Taylor (32) bestätigt, sowie durch andere Arbeitsgruppen, die die LATS bzw. LATS-Protektor-Aktivität durch eine Zunahme der sogenannten "Colloid-Droplet-Formation" bestimmen (Bitensky et al., 18; Onaya et al., 60; Shishiba et al., 66).

Orgiazzi et al. (61, 62) fanden bei einigen Patienten mit Morbus Basedow einen Human-Thyroid-Adenylcyclase-Stimulator (HTACS). Dieser HTACS erhöhte bei Inkubation von Patienten-IgG mit menschlichen Schilddrüsenmembranen die Adenylcyclase-Aktivität auch bei LATS negativen Morbus Basedow-Seren.

Wahrscheinlich handelt es sich bei allen diesen Antikörpern wie LATS = HTSI, LATS-Protector und HTACS um Antikörper gegen ein und dasselbe bis jetzt hypothetische Antigen. Dieses Antigen ist in der Schilddrüsenmembran lokalisiert, wie Untersuchungen mit fraktionierten Schilddrüsenhomogenisaten zeigten (Amino et al., 10; Benhamon et al., 16; Chopra et al., 25; Mehdi et al., 53; Schell-Frederick, 72; Schleusener et al., 74; Smith et al., 68).

1974 wurde von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen eine neue Methode zum Nachweis von TSH und LATS im Serum entwickelt, der sogenannte Radioliganden-Rezeptoren-Assay (RRA) (Mehdi et al., 53, 54; Smith und Hall, 69, 70).

Dieser beruht auf der Hemmung der Bindung von ¹²⁵Jod markiertem Rinder- oder Schweine-TSH an Rezeptoren in der menschlichen Schilddrüsenzellmembran durch schilddrüsenstimulierende Faktoren. Die im RRA nachgewiesenen schilddrüsenstimulierenden Antikörper wurden "Human-Thyroid-Stimulating-Immunoglobulins" (HTSI) genannt.

In Untersuchungen von Seren von Morbus Basedow-Patienten im RRA fanden Mukhtar et al. (57) bei allen 56 untersuchten Fällen eine HTSI-Aktivität. Mehdi (54) beschrieb eine HTSI-Aktivität bei 6 von 10 untersuchten Fällen. Schleusener et al. (75) konnten in 54 % bei 61 untersuchten Patienten eine HTSI-Aktivität nachweisen.

Die unterschiedlichen Ergebnisse im RRA für den Nachweis von HTSI im Serum von Morbus Basedow-Patienten zeigen, daß die Methode für Routineuntersuchungen noch nicht geeignet ist.

Eine Ursache könnte in der unterschiedlichen Empfindlichkeit des Assay-Systems liegen.

Während unsere Empfindlichkeit nach der Methode von Mehdi (54) zwischen 100 und 200 μ U TSH lag, beschrieben Smith und Hall (69) eine Empfindlichkeit bis zu 10 μ U TSH pro Versuchsansatz im RRA.

Um eine bessere Empfindlichkeit in unserem Radioliganden-Rezeptoren-Assay zu erreichen, führten wir Untersuchungen durch über:

1. Allgemeine Versuchsbedingungen
(Inkubationszeit, Inkubationstemperatur, Membraneinsatz).
2. Unspezifische Einflüsse des Inkubationsmediums
(Salze, Serumproteine).
3. Die präparative Aufarbeitung der Membranen.
4. Die biologische Aktivität des markierten Hormons TSH.

Ziel der Untersuchungen war die Weiterentwicklung des RRA für Routinebestimmungen der HTSI-Aktivität und TSH-Konzentrationen in menschlichen Seren.

2. Methoden

2.1. Aufarbeitung von TSH-bindenden Schilddrüsenmembranen.

2.1.1. Über Gradientenzentrifugation angereicherte Membranen (nach Mehdi und Nussey, 54)

Tiefgefrorenes Schilddrüsengewebe - Operationsmaterial von Patienten mit Morbus Basedow oder auch mit euthyreoter Struma - wurde zur Membranaufarbeitung verwendet. Alle Arbeitsvorgänge wurden bei einer Temperatur von $0-4^{\circ}\text{C}$ im Kühlraum oder im Eisbad durchgeführt. 20 - 30 g von grobem Bindegewebe befreites Schilddrüsengewebe wurde noch in gefrorenem Zustand mit einem Skalpell in feine Scheiben geschnitten und mit einer Schere weiter zerkleinert. Mit einem Silverson-Mixer-Emulsifier wurde das Material in einem Medium von 0.01 M Phosphatpuffer (PP) mit 0.14 M NaCl, 0.001 M NaHCO_3 und 0.01 M MgCl_2 bei pH 7.5 (3 ml/g Schilddrüsengewebe) sechsmal in Abständen von einer Minute jeweils 5 Sekunden lang gemixt. Die Emulsion wurde mit einem leichtgehenden Glas-Teflon-Potter-Elvehjem-Homogenisator sorgfältig dreimal homogenisiert. Das Homogenisat wurde durch zwei Lagen Gaze gefiltert.

Das Filtrat wurde in einer Sorvall-Zentrifuge mit 700 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand auf einen Saccharosegradienten geschichtet, der aus 1.31 M Saccharose in 0.01 M PP mit 0.01 M MgCl_2 und 0.001 M NaHCO_3 bestand. In einem Beckman-Ausschwingrotor 25.2 wurde der Gradient für 4 Stunden bei 25.000 UpM in einer Beckman-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Nun konnte die Membranfraktion, die sich als helle Zone über der Saccharoseschicht gebildet hatte, mit einer Pasteurpipette in Zentrifugenröhrchen abpipettiert werden. Sie wurde mit 0.01 M PP im Verhältnis 1:3 verdünnt und bei 50.000 UpM für 60 min in einem Beckman-Rotor 50 Ti zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde mit 0.01 M PP mit einer Pasteurpipette wieder suspendiert und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt.

Die Membransuspension wurde in demselben Puffer auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml eingestellt und bei -28°C eingefroren.

2.1.2. Fraktionierte Zentrifugation des Schilddrüsenhomogenats

Das wie unter 2.1.1. erhaltene gefilterte Homogenisat wurde bei 700 x g für 10 min in einer Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert und das Sediment in Homogenisationspuffer gewaschen. Beide Überstände wurden vereinigt und bei 10.000 x g für 20 min in einem Sorvall-Rotor SS 34 in einem Sorvall RC 26 zentrifugiert, das Sediment wie beim vorausgehenden Arbeitsgang nochmals gewaschen. Beide 10.000 x g Überstände wurden dann bei 25.000 x g für 20 min und die dabei gewonnenen Überstände bei 100.000 x g für 60 min zentrifugiert.

Die 700 x g-, 10.000 x g-, 25.000 x g- und 100.000 x g-Sedimente wurden noch zweimal mit 0.01 M PP bei pH 7.5 gewaschen und der Proteingehalt bestimmt.

Wie unter 2.1.1. wurde die Proteinkonzentration der Membranen auf 1 mg/ml eingestellt und bei -28°C eingefroren.

2.1.3. Membranen vom 700 - 25.000 x g Sediment

Das wie unter 2.1.1. erhaltene gefilterte Homogenisat wurde für 10 min bei 700 x g in einer Sorvall-Zentrifuge, die Überstände in einem Sorvall-Rotor SS 34 bei 25.000 x g für 20 min zentrifugiert. Diese 700 - 25.000 x g Sedimente wurden noch zweimal mit 0.01 M PP bei pH 7.5 gewaschen.

Die Membranen wurden bei -28°C sowohl als Sediment als auch in Suspension in Homogenisationspuffer eingefroren, was ihre Bindungsfähigkeit nicht beeinflusste. Sie konnten für längere Zeit verwendet werden.

2.2. Radioaktive Markierung von TSH mit ^{125}J (Jodierungs- methode nach Hunter und Greenwood, 29)

Hochgereinigtes Rinder-TSH (ein Geschenk von Prof. Dr. G. Pierce, Los Angeles) oder hochgereinigtes TSH vom Schwein (ein Geschenk von Dr. Hennen, Liège) mit einer spezifischen biologischen Aktivität von 30 - 40 U/mg wurde in 0.01 M PP bei pH 7.5 gelöst, so daß in 1 ml 0.5 mg enthalten waren. Das TSH wurde in Portionen von 5 μl ($\approx$ 2.5 μg) bei -28°C in Autoanalysercups eingefroren.

Nach der Methode von Hunter und Greenwood in der Modifikation nach Mehdi (54) wurden 2.5 μg hochgereinigtes TSH in 100 μl 0.25 M PP bei pH 7.5 gelöst. Bei Zimmertemperatur wurde dann in einer Handschuhbox 1 mCi $\text{Na}^{125}\text{Jodid}$ mit einer 10 μl Eppendorfpipette zugegeben. Mit 5 μg Chloramin T in 5 μl 0.25 M PP gelöst, wurde die Reaktion gestartet. Nach genau 60 sec wurde die Reaktion mit 15 μg Natrium-Metabisulfit, gelöst in 5 μl 0.25 M PP bei pH 7.5, beendet. Danach gab man 2 Tropfen einer Transferlösung (10 mg Bromphenolblau, 1 g Kaliumjodid, 1 g Saccharose gelöst in 100 ml 0.25 M PP) dazu. Das Gemisch wurde auf eine 15 cm hohe Sephadex G-50-Säule mit 1 cm Durchmesser gegeben, die mit 5%igem Rinder-Serum-Albumin (RSA) äquilibriert und mit 0.05 M PP gespült war. Mit einem LKB Ultraraç-Fraktionssammler wurden je 0.5 ml in Röhrchen, die 0.5 ml einer 5%igen RSA-Lösung enthielten, fraktioniert. Proben von 10 μl jeder Fraktion wurden in einem Packard- γ -Strahlen-Zähler gemessen und die spezifische Aktivität bestimmt.

Das ^{125}J -TSH wurde bei $0-4^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.3. Rechromatographie von ^{125}J -TSH

^{125}J -TSH, das älter als eine Woche war, wurde zur weiteren Benutzung durch Rechromatographie bei $0-4^{\circ}\text{C}$ vom dissoziierten ^{125}Jod gereinigt.

Die Fraktionen mit der höchsten ^{125}J -TSH-Konzentration wurde auf eine Sephadex G-50 Säule (15 cm x 1 cm), die mit 0.01 M PP mit 0.1 M NaCl und 1 mg/ml RSA bei pH 7.5 äquilibriert war, gegeben.

Es wurden Fraktionen von 0.5 ml mit einem Ultrorac-Fraktions-sammler gewonnen und deren Radioaktivität in einem Packard- γ -Strahlenzähler gemessen. Die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an markiertem TSH (peak) wurden vereinigt und bei 0-4°C gelagert.

2.4. Nachreinigung des markierten TSH (Smith und Hall, 69)

2.4.1. Aufbereitung von Bindungsmembranen für die Nachreinigung von ^{125}J -TSH

10 g tiefgefrorenes Schilddrüsen-Operationsmaterial wurde mit einem Skalpell in feine Scheiben geschnitten und mit einer Schere weiter zerkleinert. Das Material wurde etwa auf das Zehnfache seines Volumens mit kaltem 0.01 M PP bei pH 7.5 verdünnt und in einem Sorvall-Homogenisator homogenisiert. Das Homogenisat wurde bei 2.500 UpM in einem Sorvall-Rotor SS 34 für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde 15 min in einer Beckman-Ultrazentrifuge in einem Beckman-Rotor 50 Ti bei 13.000 UpM zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10 ml 0.01 M PP mit 0.05 M NaCl und 1 mg/ml RSA bei pH 7.5 mit einem Dounce-Homogenisator in Suspension gebracht. Diese wurde in 3 Röhrchen für den Beckman-Rotor 50 Ti im Kühlraum bei 0-4°C gelagert.

Alle Arbeitsgänge wurden bei einer konstanten Temperatur von 0-4°C durchgeführt.

2.4.2. Reinigung des ^{125}J -TSH durch Bindung an Schilddrüsenmembranen

Je 50 μl ^{125}J -TSH, markiert nach der Methode von Hunter und Greenwood (29), wurden zu den hierfür aufgearbeiteten Schilddrüsenmembranen gegeben und bei 37°C für 30 min inkubiert.

Die Röhrchen wurden mit kaltem 0.01 M PP mit 0.05 M NaCl und 1 mg/ml RSA aufgefüllt und 15 min bei 20.000 UpM in einem Beckman-Rotor 50 Ti zentrifugiert. Das Sediment wurde in demselben Puffer noch zweimal gewaschen. Das daraus hervorgehende Sediment wurde in 5 ml einer 2 M NaCl-Lösung, die 1 mg/ml RSA enthielt, suspendiert und bei 0-4°C für 30 min inkubiert. In einem Beckman-Rotor 50 Ti wurde für 30 min bei 50.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 0-4°C auf eine 40 cm x 2.6 cm Sephadex G-100 Säule gegeben, die mit 0.01 M PP mit 0.05 M NaCl und 1 mg/ml RSA äquilibriert war. Fraktionen mit je 2 ml wurden gesammelt. Jeder Fraktion wurden 50 µl Proben entnommen und deren Radioaktivität in einem Packard-γ-Strahlen-Zähler gemessen. Die Fraktionen mit dem ^{125}J -TSH-Peak wurden vereinigt und mit 0.01 M PP mit 0.05 M NaCl und 1 mg/ml RSA auf 10.000 IpM/50 µl eingestellt.

Dieses gereinigte ^{125}J -TSH wurde bei -70°C eingefroren. Es war etwa für zwei Wochen ausreichend biologisch aktiv.

2.5. Aufarbeitung von Immunglobulinen durch Fällung mit Ammoniumsulfat

Die Isolierung von Immunglobulinen aus Humanserum wurde in Alteration nach der Fällungsmethode nach D. M. Weir (81) durchgeführt.

Serum und 3.75 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung wurden im Verhältnis 4:3 langsam und unter ständigem Rühren vermischt. Nach 20 min Inkubation bei Zimmertemperatur wurde die Suspension bei 0-4°C für 20 min bei 2.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment zweimal mit 1.6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gewaschen. Danach wurde das Sediment in 0.5 Teilen aqua bidestillata von der Ausgangsmenge des Serums in Lösung gebracht. In Dialyseschläuchen wurde die IgG-Lösung gegen 0.01 M PP mit 0.05 M NaCl bei pH 7.5 bei 0-4°C für mindestens 24 h dialysiert und in einem Beckman-Rotor 50 Ti für 30 min bei 50.000 UpM zentrifugiert. Die Überstände enthielten die Immunglobulin G-Fraktion.

Zur Proteinbestimmung wurden von jedem Überstand 50 µl mit 3 ml des Dialysepuffers verdünnt und die Absorption bei 280 nm in 1 cm Quarzküvetten mit einem Beckman Digital-DB-GT-Spektralfotometer gemessen.

Danach wurden die Proben mit Dialysepuffer auf 20 mg/ml Protein eingestellt, was einer Absorption von 0.46 entsprach. Die Proben wurden bei -70°C eingefroren.

2.6. Bestimmung der Membrankonzentrationen - Standardkurve

Quantitativ wurde die Membrankonzentration im RRA durch die Bestimmung der Proteinkonzentration der Membransuspension erfaßt. Es wurde dafür die Methode nach O.H. Lowry (40) verwendet. Zur Erstellung einer Eichkurve für die Proteinbestimmung wurden 10 mg Rinderserumalbumin der Firma Serva in 50 ml aqua bidestillata gelöst und durch eine Verdünnungsreihe Proteinkonzentrationen von 0.2 bis 0.0125 mg/ml hergestellt.

1 ml jeder Verdünnung wurde nach der Methode von O.H. Lowry (40) zur Proteinbestimmung angesetzt. Mit einem Beckman Digital-DB-GT-Spektralfotometer wurde bei 750 nm gegen einen Leerwert die Absorption gemessen.

Die Werte dieser Eichkurve lagen allen Proteinbestimmungen zugrunde (Abb. 1).

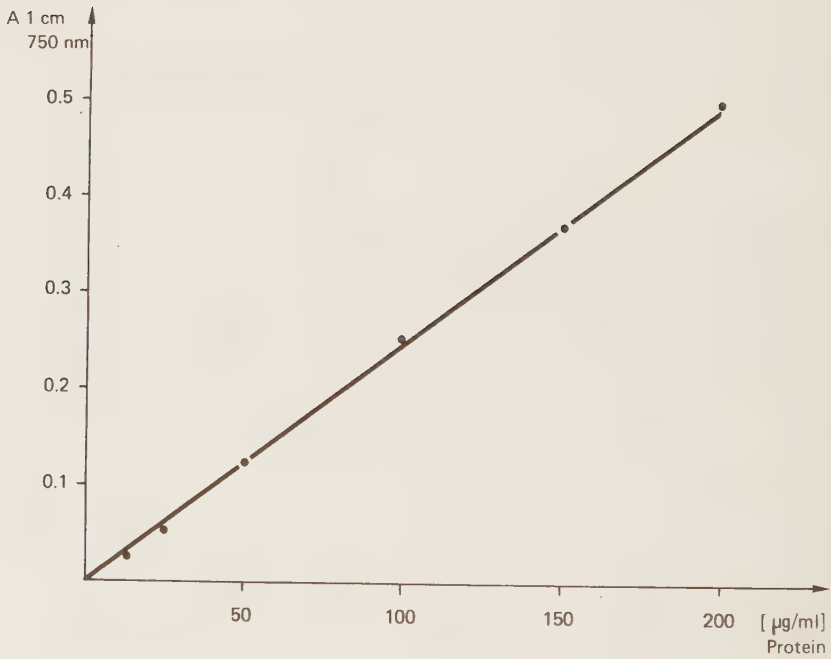


Abb. 1 Mit einer Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin wurde nach der Methode von O.H. Lowry (40) eine Eichkurve erstellt, die allen Proteinbestimmungen zugrunde lag.

2.7. Radioliganden-Rezeptoren-Assay (RRA)

2.7.1. Bindung von $^{125}\text{J-TSH}$ an menschliche Schilddrüsenmembranen (Methode nach Mehdi)

Tiefgefrorene gereinigte Membranen, aufgearbeitet nach der Methode von Mehdi und Nussey, wurden aufgetaut und bei $0-4^{\circ}\text{C}$ in 0.01 M PP mit einem Dounce-Homogenisator in Suspension gebracht.

0.4 ml Membranen (1 mg Protein/ml) wurden bei $35 - 37^{\circ}\text{C}$ mit 0.2 ml von 0.01 M PP mit 0.14 M NaCl und 0.001 M NaHCO_3 bei $\text{pH } 7.5$ vorinkubiert. Kontrollproben enthielten für die unspezifische Bindung unmarkiertes TSH im Überschuß ($0.4\text{ U Thyreostimulin Organon}$).

Anschließend wurden alle Proben mit einer Dosis von 20.000 bis 50.000 IpM von $^{125}\text{J-TSH}$ für zwei bis drei Stunden inkubiert.

Die Inkubationszeit wurde mit Zugabe von 3 ml kaltem Inkubationspuffer ($0-4^{\circ}\text{C}$) beendet und die Proben im Beckman-Rotor 50 Ti bei 50.000 UpM für 60 min bei $0-4^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert.

Der Überstand, in dem sich das freie, nicht gebundene $^{125}\text{J-TSH}$ befand, wurde sorgfältig mit einer Pasteurpipette in ein Packard-Röhrchen abpipettiert. Das Sediment, das membrangebundenes $^{125}\text{J-TSH}$ enthielt, wurde mit dem dazugehörenden Überstand in einem Packard- γ -Strahlen-Zähler gemessen.

Der Quotient aus der Radioaktivität des Sediments und der des Überstandes ergab die Bindung von $^{125}\text{J-TSH}$ an Membranen in Prozent ausgedrückt:

$$\text{Bindung} = \frac{\text{IpM} \times \text{gebundenes } ^{125}\text{J-TSH}}{\text{IpM} \times \text{freies } ^{125}\text{J-TSH}} \times 100 = \frac{B}{F} \times 100$$

Aus den Proben erhielt man zunächst die Gesamtbindung.

Aus den Kontrollproben mit unmarkiertem TSH im Überschuß wurde die unspezifische Bindung bestimmt. Durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung wurde die spezifische Bindung errechnet.

Alle Proben wurden als Doppelwerte angesetzt.

2.7.2. Nachweis von HTSI im RRA (nach Mehdi)

Tiefgefrorene menschliche Schilddrüsenmembranen wurden aufgetaut und im Eisbad bei $0-4^{\circ}\text{C}$ in 0.01 M PP in einem Dounce-Homogenisator suspendiert. Jeweils 0.4 ml Membranen mit einer Proteinkonzentration von 1 mg Protein/ml wurden mit 0.2 ml HTSI-Serum bzw. $\text{HTSI-Ammoniumsulfatpräzipitat}$ und 0.2 ml von 0.01 M PP mit 0.14 M NaCl und 0.001 M NaHCO_3 bei $\text{pH } 7.5$ bei 37°C für 20 min vorinkubiert. Für die unspezifische Bindung enthielten Kontrollproben 0.4 U unmarkiertes TSH (Thyreostimulin Organon) gelöst in 0.2 ml Inkubationspuffer.

Gleichzeitig wurden unter denselben Bedingungen zur Bestimmung eines Leerwertes Membranen und Normalserum bzw. Membranen und Normal-IgG von äquivalenter Proteinkonzentration vorinkubiert. Auch hier enthielten Kontrollen 0.4 U unmarkiertes TSH.

Nach der Vorinkubation wurden alle Proben mit $^{125}\text{J-TSH}$ mit einer Dosis an Radioaktivität von ca. 20.000 IpM bei $35-37^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Zur Beendigung der Inkubationszeit wurden 3 ml kalter Inkubationspuffer zu den Proben gegeben. Nun wurde im Beckman-Rotor 50 Ti für 60 min bei 50.000 UpM bei $0-4^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert.

Der Überstand, in dem sich das freie nicht gebundene $^{125}\text{J-TSH}$ befand, wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig vom Sediment getrennt. Das Sediment, das den an Membranen gebundenen Anteil an $^{125}\text{J-TSH}$ enthielt, wurde mit seinem entsprechenden Überstand in einem Packard- γ -Strahlen-Zähler gemessen.

Die Bindung wurde mit dem Quotienten aus der Radioaktivität des Sediments und der des Überstandes in Prozent ausgerechnet.

$$\text{Bindung} = \frac{\text{IpM} \times \text{gebundenes } ^{125}\text{J-TSH}}{\text{IpM} \times \text{freies } ^{125}\text{J-TSH}} \times 100 = \frac{\text{B}}{\text{F}} \times 100$$

Durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung wurde die spezifische Bindung bestimmt.

HTSI galt als nachgewiesen, wenn in Bezug auf die Proben mit Normalserum bzw. Normal IgG sich eine Bindungshemmung von $^{125}\text{J-TSH}$ an Membranen abzüglich der doppelten Standardabweichung erwies. Alle Proben wurden in Doppelwerte angesetzt.

2.7.3. Der modifizierte RRA

Aufgrund eigener Untersuchungsergebnisse wurde der RRA nach Mehdi in folgenden Punkten geändert:

1. Membranaufarbeitung
2. Membranproteinkonzentration
3. Inkubationszeiten

Als Bindungsmembranen wurden die Membranen des 700 x g bis 25.000 x g Sediments verwendet, mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml. 50 µl der Membransuspension wurden mit 100 µl von 0.01 M PP mit 0.14 M NaCl und 0.001 M NaHCO₃ und mit 50 µl ¹²⁵J-TSH (ca. 20.000 IpM) bei 37°C für 45 min inkubiert. Kontrollproben enthielten zur Bestimmung der unspezifischen Bindung unmarkiertes TSH im Überschuß (0.5 U Thyreostimulin Organon). Die Inkubationszeit wurde mit 1.7 ml kaltem Inkubationspuffer bei 0-4°C beendet. Nach Zentrifugation bei 50.000 UpM für 30 min in einem Beckman-Rotor 50 Ti mit Adapter bei 0-4°C wurde die Radioaktivität von gebundenem und freiem ¹²⁵J-TSH gemessen und wie unter 2.7.1. die spezifische Bindung bestimmt.

In späteren Versuchen wurde die Bindung nicht mehr über den Quotienten aus der Radioaktivität des Sediment und des Überstandes ermittelt, sondern mit dem Quotienten aus der Radioaktivität des Sediments und der gemessenen Totalradioaktivität (20.000 IpM) bestimmt und in Prozent ausgedrückt.

$$\text{Bindung} = \frac{\text{IpM} \times \text{gebundenes } ^{125}\text{J-TSH}}{\text{IpM} \times \text{totales } ^{125}\text{J-TSH}} \times 100 = \frac{\text{B}}{\text{T}} \times 100$$

3. Resultate

3.1. TSH-Standardkurve

Einfluß von steigenden Dosen von unmarkiertem TSH (Thyreostimulin Organon) auf die Bindung von ^{125}J -TSH an angereicherte Membranen (Markierung nach der Methode von Hunter und Greenwood).

Thyreostimulin wurde mit Inkubationspuffer PPNB auf zunehmende Konzentrationen von 11.3 bis 40.000 μU TSH/Versuchsansatz eingestellt. Membranen entsprechend 400 μg Protein wurden jeweils mit einer Verdünnung für 20 min vorinkubiert. Mit markiertem TSH wurde für 100 min inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml kaltem Inkubationspuffer wurde durch Ultrazentrifugation bei 50.000 UpM für 60 min gebundene von freier Radioaktivität getrennt und die Werte der Gesamtbindung bestimmt. Ein Leerwert ohne unmarkiertes TSH im Inkubationsmedium war zum Vergleich angesetzt.

Thyreostimulin	(μU)	0	11.3	68	113	227	680
Gesamtbindung	($\frac{\text{B}}{\text{F}} \times 100$)	11.6	12.4	11.4	11.7	10.3	9.1
		13.0	-	11.6	12.3	-	9.4

Thyreostimulin	(μU)	1360	13600	136000	400000
Gesamtbindung	($\frac{\text{B}}{\text{F}} \times 100$)	6.1	2.5	1.6	1.0
		7.5	3.2	1.6	1.1

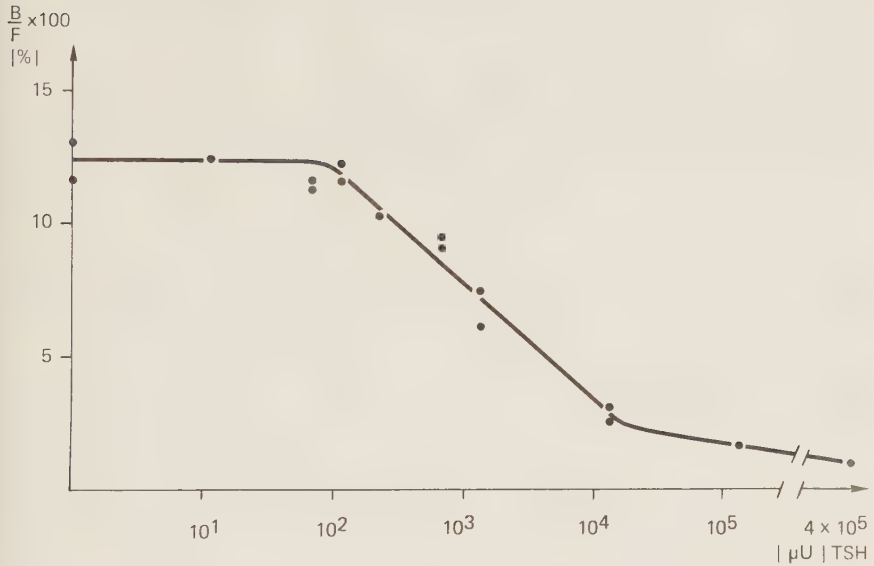


Abb. 2 Standardkurve für TSH im RRA:

Die Angaben auf der Abszisse geben die Konzentrationen von TSH im Inkubationsansatz an. Die Bindung bei $4 \times 10^5 \mu U = 400 \text{ mU TSH}$ (Thyreostimulin Organon) entspricht der unspezifischen Bindung im RRA.

3.2. HTSI-Standardkurve

Einfluß einer Verdünnungsreihe von HTSI-Ammoniumsulfatpräzipitat auf die ^{125}J -TSH-Bindung an angereicherte Membranen.

0.4 ml Membranen (1 mg Protein/ml) wurden mit zunehmenden Konzentrationen einer HTSI-Lösung bei 37°C für 20 min vorinkubiert und für 120 min mit ^{125}J -TSH inkubiert. Der Proteingehalt der HTSI-Lösung war mit Normal-IgG auf 20 mg Protein/ml ausgeglichen.

Kontrollproben enthielten unmarkiertes TSH im Überschuß. Durch Ultrazentrifugation wurde gebundene und freie ^{125}J -TSH-Radioaktivität getrennt und die spezifische Bindung bestimmt.

HTSI	(μl)	-	3.12	6.25	12.5	25	100
Verdünnung		-	1:32	1:16	1:8	1:4	1:1
spezi- fische Bindung	($\frac{\text{B}}{\text{F}} \times 100$)	13.1	12.8	10.4	8.1	4.8	1.5

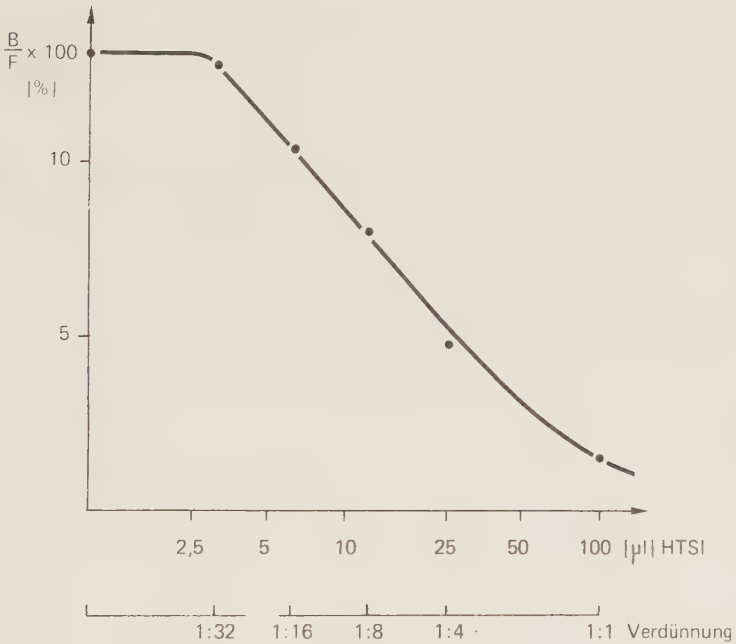


Abb. 3 Bindungshemmung durch verschiedene HTSI-Konzentrationen im RRA: Angereicherte Membranen (0.4 mg Protein/Probe) wurden mit zunehmenden Konzentrationen von HTSI-Ammoniumsulfatpräzipitat (Verdünnung von 1:32 bis 1:1) mit ^{125}J -TSH inkubiert.

3.3. Einfluß von Inkubationszeit

3.3.1. Bindung von ^{125}J -TSH an angereicherte Schilddrüsenmembranen als Funktion der Zeit (nach Mehdi)

Um die Bindung des markierten TSH an thyreoide Membranen in Abhängigkeit von der Zeit zu zeigen, wurde der RRA bei konstanter Temperatur mit unterschiedlichen Inkubationszeiten durchgeführt.

Jeweils 0.4 ml angereicherte Membranen mit einer Proteinkonzentration von 1 mg pro ml wurden mit Inkubationspuffer oder zur Bestimmung der unspezifischen Bindung mit 400 mU unmarkiertem TSH bei 37°C für 20 min vorinkubiert. Allen Proben wurde 20.000 IpM markiertes TSH dazugegeben und für 15 min, 30 min, 60 min, 120 min und 180 min inkubiert.

Die Inkubationszeit wurde mit Zugabe von 3 ml kaltem ($0-4^{\circ}\text{C}$) Inkubationspuffer beendet. Die Proben wurden zur Trennung von gebundenem und freien ^{125}J -TSH bei 50.000 UpM für 60 min zentrifugiert.

Es wurde $\frac{B}{F} \times 100$ gemessen und die spezifische Bindung bestimmt.

Zeit	(min)	0	15	30	60	120	180
Gesamtbindung	$(\frac{B}{F} \times 100)$	2.6	7.3	10.7	12.1	13.1	13.9
unspezifische Bindung	$(\frac{B}{F} \times 100)$	1.2	1.1	1.6	1.7	1.5	1.9
spezifische Bindung	$(\frac{B}{F} \times 100)$	1.4	6.2	9.1	10.4	11.6	11.8

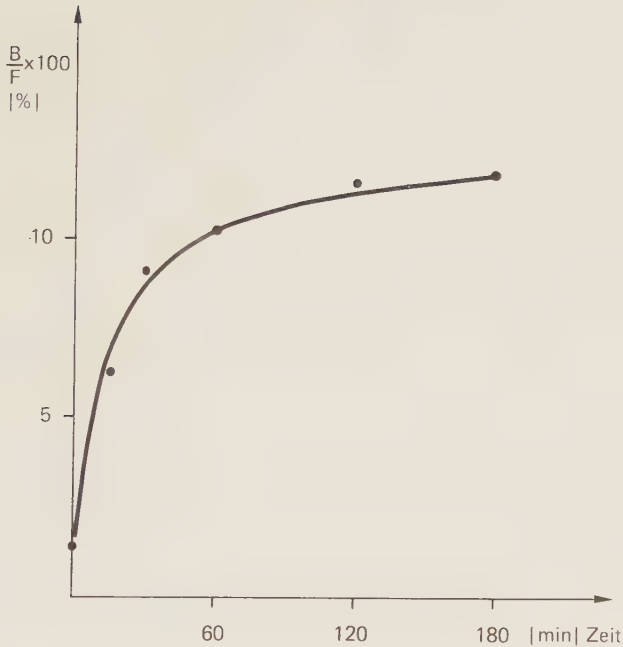


Abb. 4 Bindung von ^{125}J -TSH an 0.4 ml angereicherte Membranen über einen Saccharosegradienten nach Mehdi mit der Proteinkonzentration von 1 mg/ml als Funktion der Zeit. Die Inkubationszeiten auf der Abszisse aufgetragen betrugen 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min und 180 min. Auf der Ordinate ist die spezifische Bindung in $\frac{B}{F} \times 100$ angegeben.

3.3.2. ^{125}J -TSH-Bindung an Schilddrüsenmembranen vom 700 bis 25.000 x g Sediment als Funktion der Zeit. Die Einwirkung unterschiedlicher Konzentrationen von unmarkiertem TSH während der Inkubationszeit (Modifikation)

Membranen des 700 - 25.000 x g Sediments wurden in einem Medium von PPNB mit 20.000 IpM markiertem TSH bei 37°C inkubiert. Die erste Probenreihe wurde sofort mit kaltem Inkubationspuffer (0-4°C) aufgefüllt und bei 50.000 UpM zentrifugiert. Die Inkubationszeit der anderen Proben wurden jeweils nach 15 min, 30 min, 60 min, 120 min und 240 min mit Zugabe von kaltem Inkubationspuffer beendet. Bei 50.000 UpM wurde für 60 min zentrifugiert. Die Radioaktivität von gebundenem und freiem ^{125}J -TSH gemessen und die Gesamtbindung bestimmt.

In Parallelversuchen wurden Membranen zusätzlich mit 30 µU unmarkiertem TSH inkubiert, in einem weiteren Versuch mit 500 mU unmarkiertem TSH.

Zeit	(min)	0	15	30	60	120	240
0 µU TSH Gesamt- bindung	$(\frac{B}{F} \times 100)$	7.2	15.7	16.3	19.7	22.8	23.9
30 µU TSH Gesamt- bindung	$(\frac{B}{F} \times 100)$	4.8	10.8	-	15.8	-	21.1
500 mU TSH Gesamt- bindung	$(\frac{B}{F} \times 100)$	1.8	2.0	2.5	2.3	2.4	2.8

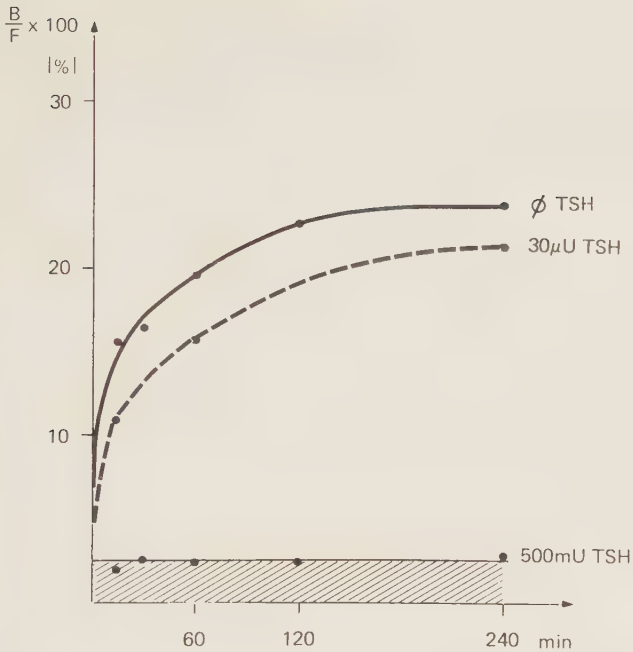


Abb. 5 ¹²⁵J-TSH-Gesamtbindung an Schilddrüsenmembranen vom 700-25.000 x g Sediment als Funktion der Zeit: 50 µl Membranen (1 mg Protein/ml) wurden 0, 15, 30, 60, 120 und 240 min mit 20.000 IpM ¹²⁵J-TSH in PPNB inkubiert. Die durchgezogene Linie zeigt die Gesamtbindung ohne Einsatz von unmarkiertem TSH (Thyreostimulin); die gestrichelte Linie zeigt die Bindung mit Zusatz von 30 µU TSH im Inkubationsmedium. Die schraffierte Fläche stellt die unspezifische Bindung mit Zusatz von 500 mU TSH im Inkubationsmedium dar.

3.4. Die Bindung von ^{125}J -TSH an Schilddrüsenmembranen als Funktion der Temperatur

Angereicherte Membranen wurden für 20 min in 0.01 M PP mit 0.14 M NaCl und 0.001 M NaHCO_3 vorinkubiert, wobei Kontrollproben 400 mU Thyreostimulin Organon enthielten. Es wurde mit 20.000 IpM markiertem TSH für 120 min bei 0-4°C, 22°C, 33°C und 38°C inkubiert. Danach wurden 3 ml kalter Inkubationspuffer (0-4°C) dazugegeben. Um gebundenes von freiem ^{125}J -TSH zu trennen wurde bei 50.000 UpM für 60 min zentrifugiert. Von den Proben wurde die Radioaktivität gemessen und die spezifische Bindung bestimmt.

Temperatur	(°C)	0-4	22	30	38
Gesamt- bindung	$(\frac{B}{F} \times 100)$	5.1	8.2	10.5	21.3
unspezi- fische Bindung	$(\frac{B}{F} \times 100)$	2.0	2.3	2.0	2.1
Spezi- fische Bindung	$(\frac{B}{F} \times 100)$	3.1	5.9	8.4	19.2

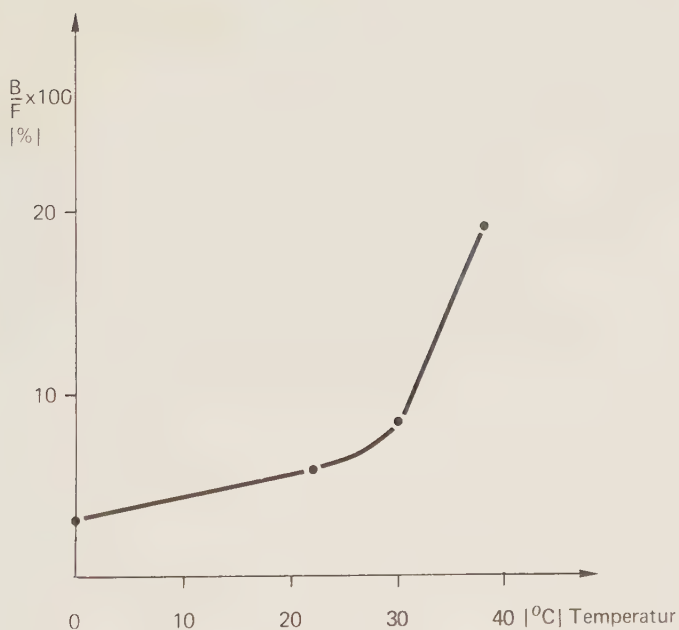


Abb. 6 ^{125}J -TSH-Bindung an angereicherte Membranen als Funktion der Temperatur:

In Abhängigkeit von der Temperatur wurden 0.4 ml Membranen (1 mg Protein/ml) mit 20.000 IpM markiertem TSH für 120 min bei 0-4°C 22°C, 30°C und 38°C in PPNB inkubiert. Zwischen 25 und 30°C nimmt die Bindungsfähigkeit deutlich zu.

3.5. Einfluß der Membranproteinkonzentration

3.5.1. Bindung von ^{125}J -TSH an angereicherte Schilddrüsenmembranen in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (nach Mehdi)

Um die optimale Konzentration von menschlichen Schilddrüsenmembranen für die Bindung von ^{125}J -TSH zu bestimmen, wurden Membran-Proteinkonzentrationen von 35 µg Protein/ml bis 1.050 µg Protein/ml untersucht.

Von den einzelnen Konzentrationen wurden 0.6 ml in Inkubationspuffer bei pH 7.5 für 20 min vorinkubiert, wobei Kontrollwerte 400 mU unmarkiertes TSH (Thyreostimulin Organon) zur Bestimmung der unspezifischen Bindung enthielten. Die Proben wurden mit 20.000 IpM markiertem TSH für 100 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von kaltem Inkubationspuffer (0-4°C wurde durch Ultrazentrifugation gebundenes von freiem ^{125}J -TSH getrennt. Es wurde gebundene (B) und freie (F) Radioaktivität gemessen und die spezifische Bindung bestimmt.

Protein- konzentration	(µg Protein/ml)	35	70	175	350	700	1.050
Gesamt- bindung	$(\frac{B}{F} \times 100)$	2.3	5.3	11.5	19.6	25.2	29.4
unspezi- fische Bindung	$(\frac{B}{F} \times 100)$	0.4	0.8	0.9	1.7	2.9	3.3
spezi- fische Bindung	$(\frac{B}{F} \times 100)$	1.9	4.5	10.6	19.6	22.3	24.1

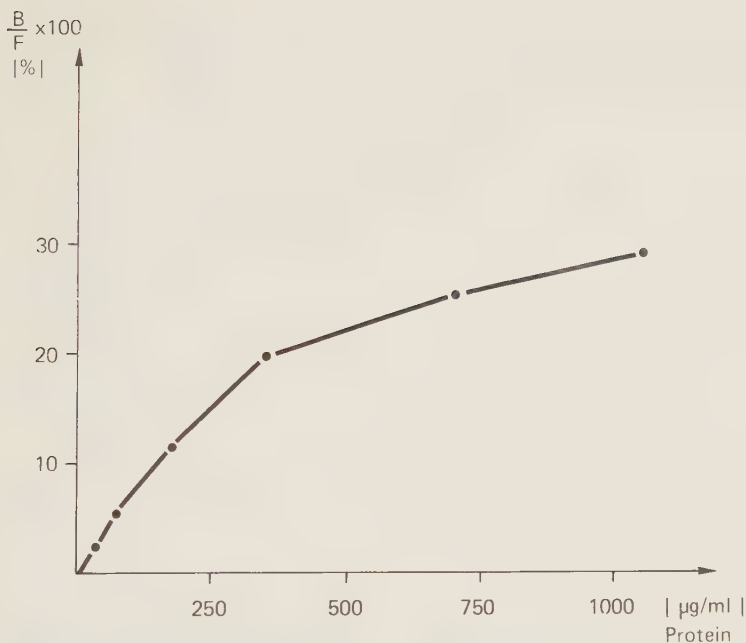


Abb. 7 Bindung von ^{125}J -TSH bei verschiedenen Proteinkonzentrationen von angereicherten Membranen:
0.6 ml angereicherte Membranen mit zunehmender Proteinkonzentration von 35 µg Protein/ml bis 1.050 µg Protein/ml pro Probe wurden mit 20.000 IPM ^{125}J -TSH für 100 min bei 37°C inkubiert. Eine ausreichende Bindung wurde bei 400 µg Protein/ml erreicht.

3.5.2. Bindung von $^{125}\text{J-TSH}$ an Membranen vom 700 - 25.000 x g Sediment in Abhängigkeit von der Membran-Proteinkonzentration (Modifikation)

Im Vergleich zu der $^{125}\text{J-TSH}$ -Bindung an sogenannte angereicherte Membranen (3.5.1.) wurde die Bindung an die 700 - 25.000 x g Sedimentmembranen bei zunehmender Membran-Proteinkonzentration von 20 bis 1.000 μg Protein/ml getestet.

Die Membranen wurden in 0.6 ml PPNB mit $^{125}\text{J-TSH}$ (20.000 IpM) für 120 min bei 37°C inkubiert. Kontrollen enthielten Thyreostimulin im Überschuß. Nach Trennung von gebundenem und freiem markiertem TSH wurde die spezifische Bindung bestimmt.

Membran- proteine	(μg Protein/ml)	20	50	100	200	400	1000
Gesamt- bindung	($\frac{B}{F} \times 100$)	15.4	24.8	37.3	43.8	52.1	64.8
unspezi- fische Bindung	($\frac{B}{F} \times 100$)	1.6	3.1	6.5	8.6	14.3	28.5
spezi- fische Bindung	($\frac{B}{F} \times 100$)	13.8	21.7	30.8	35.2	37.8	37.3

Bei den Membranen vom 700 - 25.000 x g Sediment kommt bei 50 μg Proteineinsatz schon ausreichende Bindung zustande. Die Bindungswerte liegen bei diesem Versuch sehr hoch, da die Inkubation in Phosphatpuffer (0.01 M PP) durchgeführt wurde.

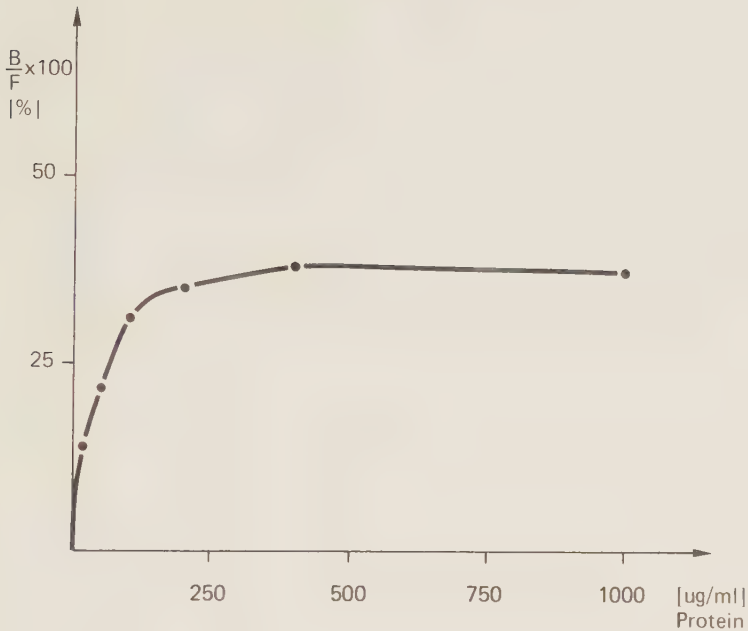


Abb. 8 Bindung von ^{125}I -TSH an die 700 - 25.000 x g Membranfraktion in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration: Die Membranen mit Proteinkonzentrationen von 20 bis 1000 μg Protein/ml (Abszisse) wurden in PP inkubiert. Kontrollen enthielten Thyreostimulin im Überschuß. Die spezifische Bindung wurde auf der Ordinate aufgetragen.

3.6. Einfluß der NaCl-Konzentration im Inkubationsmedium auf die Bindung von ^{125}J -TSH an angereicherte Membranen

Da die ^{125}J -TSH-Bindung in 0.01 M PP bei pH 7.5 bis zum dreifachen höher war als unter Anwesenheit von 0.14 M NaCl im Inkubationsmedium, wurde der Einfluß verschiedener Konzentrationen von NaCl im Inkubationsmedium untersucht.

Je 0.4 ml Membranen (1mg Protein/ml), suspendiert in 0.01 M PP mit 0.001 M NaHCO_3 wurden mit einer Verdünnungsreihe auf NaCl-Konzentrationen von 4 μM bis 240 μM gebracht. Zusammen mit Kontrollproben, die Thyreostimulin im Überschuß enthielten, wurde für 20 min vorinkubiert. Anschließend wurde mit markiertem TSH für 120 min inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml kaltem Inkubationspuffer wurde bei 50.000 UpM für 60 min zentrifugiert. Von Sediment und Überstand wurde die Radioaktivität gemessen und die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung bestimmt.

NaCl	(μM)	0	4	12	70	120	240
Gesamt-Bindung	($\frac{B}{F} \times 100$)	26.3	23.1	17.9	12.3	8.6	6.6
unspezifische Bindung	($\frac{B}{F} \times 100$)	5.8	5.6	4.9	3.9	3.3	2.0
spezifische Bindung	($\frac{B}{F} \times 100$)	20.5	17.5	13.0	8.4	5.3	4.6

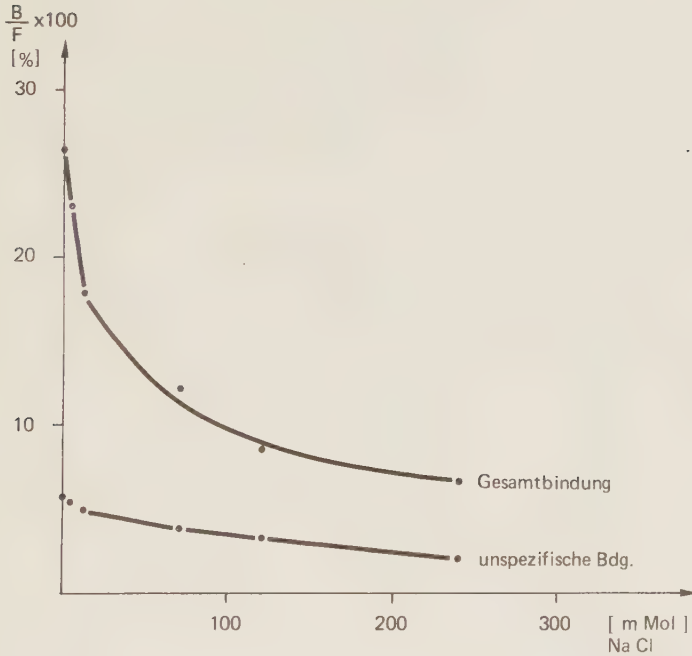


Abb. 9 Einfluß von NaCl im Inkubationsmedium:

Angereicherte Schilddrüsenmembranen (0.4 mg Protein/ml) wurden in PPB mit NaCl-Konzentrationen von 0, 4, 12, 70, 120 und 240 μ M mit 20.000 IpM 125 J-TSH für 120 min bei 37°C inkubiert. Gesamtbindung und unspezifische Bindung nahmen mit steigender NaCl-Konzentration ab.

3.7. Vergleich zwischen der Bindungshemmung von $^{125}\text{J-TSH}$ an angereicherte Schilddrüsenmembranen durch HTSI-Serum und HTSI-Ammoniumsulfatpräzipitat

Je 0.4 ml angereicherte Membranen (1 mg Protein/ml) wurden mit 50 μl Normalserum (70 mg Protein/ml) bzw. HTSI-Serum (70 mg Protein/ml) und 50 μl Normal-ASP (19.2 mg Protein/ml) bzw. HTSI-ASP (18.1 mg Protein/ml) mit $^{125}\text{J-TSH}$ (20.000 IpM) für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Kontrollproben enthielten 400 mU Thyreostimulin. Nach Zugabe von 3 ml kaltem Inkubationspuffer und Ultrazentrifugation bei 50.000 UpM für 60 min bei $0 - 4^\circ\text{C}$ wurde das gebundene und freie $^{125}\text{J-TSH}$ gemessen und die spezifische Bindung bestimmt. Für Thyreostimulin wurde bei diesem Versuch nicht vorinkubiert. Bei demselben Versuch wurde eine zweite Untersuchungsreihe mit einer Vorinkubationszeit von 2 Stunden für die Bindung von unmarkiertem TSH (Thyreostimulin) an die Membranen durchgeführt. Es konnte dadurch gezeigt werden, daß die unspezifische Bindung der Proben nicht weiter gesenkt werden konnte. In Abb. 10 wurden diese Ergebnisse nicht berücksichtigt.

<u>Serum:</u>		N	HTSI	<u>ASP:</u>		N	HTSI
Gesamtbindung	$\left(\frac{B}{F} \times 100\right)$	15.7	10.7			22.2	12.7
unspezifische Bindung	$\left(\frac{B}{F} \times 100\right)$	2.7	1.5			1.8	1.8
spezifische Bindung	$\left(\frac{B}{F} \times 100\right)$	13.0	9.2			20.4	10.9
Hemmung	(%)		29.2				46.6

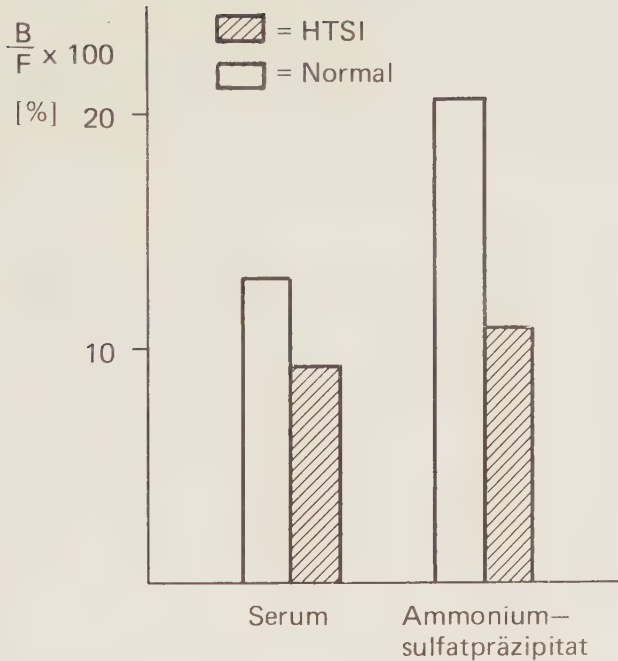


Abb. 10 Vergleich der Bindungshemmung von ^{125}J -TSH an angereicherte Membranen durch HTSI im Serum und HTSI als Ammoniumsulfatpräzipitat:
Membranen (1 mg Protein/ml) wurden mit Normalserum bzw. HTSI-Serum und Normal-ASP bzw. HTSI-ASP und mit 20.000 IpM ^{125}J -TSH bei 37°C inkubiert. Es zeigt sich, daß gegenüber dem Normal-IgG im Normalserum ein hemmender Faktor auf die ^{125}J -TSH-Bindung vorhanden sein muß. Serum und ASP enthielten äquivalente IgG-Konzentrationen.

3.8. Einfluß der Proteinfractionen von Normalserum auf die Bindung von ^{125}J -TSH an Membranen vom 700 - 25.000 x g Sediment

Je 100 μg Membranen (0.1 ml) wurden mit 7 mg Normalserum, 4 mg Albumin (Firma Serva), 2,2 mg α -Globulin (Firma Serva), 2.2 mg β -Globulin (Firma Serva), 2.2 mg γ -Globulin (Firma Serva), 2.2 mg IgG-Lösung (Ammoniumsulfatpräzipitat) und einem Leerwert mit Puffer in einem Medium von 0.01 M PP und 0.05 M NaCl bei 37°C für 45 min inkubiert. Nach Trennung von gebundenem und freiem ^{125}J -TSH wurde die Gesamtbindung bestimmt.

Protein- fraktion		Puffer	N.Serum	Albumin	α -Glob.	β -Glob.	γ -Glob.	IgG
Gesamt- bindung		25.6	7.5	27.5	14.7	13.9	20.2	19.6
	$\left(\frac{B}{F} \times 100\right)$	24.7	7.2	27.0	14.1	13.3	19.1	18.3
		23.2	5.8	25.9	12.9	12.0	18.7	18.0
Hemmung	(%)	-	73	0	47	47	25	25

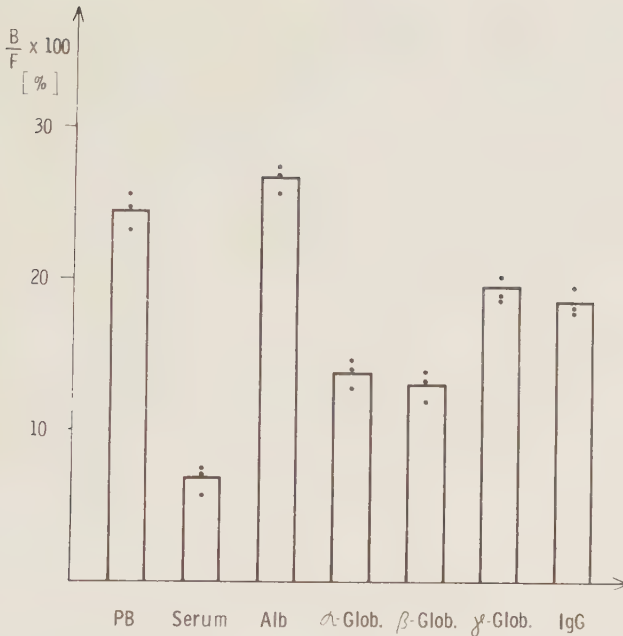


Abb. 11 Hemmender Einfluß verschiedener Serumproteinfraktionen auf die Bindung von ^{125}J -TSH an Membranen vom 700 - 25.000 x g Sediment. Der Proteingehalt/Probe betrug 7 mg für Normalserum (NS), 4 mg für Albumin (Alb), 2.2 mg für die α -, β -, γ -Globuline (α -Glob, β -Glob, γ -Glob) und Immunglobuline G (IgG). PB entspricht 0.01 M Phosphatpuffer mit 0.05 M NaCl bei pH 7.5.

3.9. Dosisabhängige Hemmung der Bindung von $^{125}\text{J-TSH}$ an angereicherte menschliche Schilddrüsenmembranen durch Proteinfraktionen aus Normalserum im Vergleich zu HTSI

In diesem Versuch wurden Verdünnungen von Albumin (Firma Serva), α -Globulinen (Firma Serva), Normal-IgG (Ammoniumsulfatfällung) und HTSI (Ammoniumsulfatfällung) mit 50 μl Membranen vom 700 - 25.000 x g Sediment (1 mg Protein/ml) in PPNB für 45 min mit $^{125}\text{J-TSH}$ (20.000 IpM) bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1.7 ml kaltem Inkubationspuffer ($0-4^\circ\text{C}$) wurde durch Ultrazentrifugation gebundenes von freiem $^{125}\text{J-TSH}$ getrennt und die Gesamtbindung berechnet. Die Bindung des Leerwertes wurde als 100 % gesetzt und darauf der Anteil der Bindungswerte bezogen.

Albumin	(mg Protein/ml)	0	1.04	2.08	4.16	8.3	16.6	33.3	66.6
Gesamtbindung	$\left(\frac{B}{T} \times 100\right)$	24.4	25.1	26.1	25.7	25.4	23.5	21.4	19.5
Anteil	(%)	100	103	107	105.3	104.1	96.3	87.7	79.9
α -Glob.	(mg Protein/ml)	0	1.6	3.3	6.6	13.3	26.6		
Gesamtbindung	$\left(\frac{B}{T} \times 100\right)$	31.3	29.4	27.7	24.4	19.7	16.0		
Anteil	(%)	100	93.9	88.5	78.0	62.9	51.1		
N-IgG	(mg Protein/ml)	0	0.4	0.73	1.53	3.1	6.1	12.1	24.3
Gesamtbindung	$\left(\frac{B}{T} \times 100\right)$	33.0	26.5	26.0	23.4	22.7	20.2	15.8	14.2
Anteil	(%)	100	80.3	78.8	70.9	68.8	61.2	47.9	43.0
HTSI	(mg Protein/ml)	0	0.25	0.5	1.1	2.0	8.0		
Gesamtbindung	$\left(\frac{B}{T} \times 100\right)$	13.1	12.8	10.4	8.05	4.75	1.5		
Anteil	(%)	100	97.7	79.4	61.4	36.3	11.5		

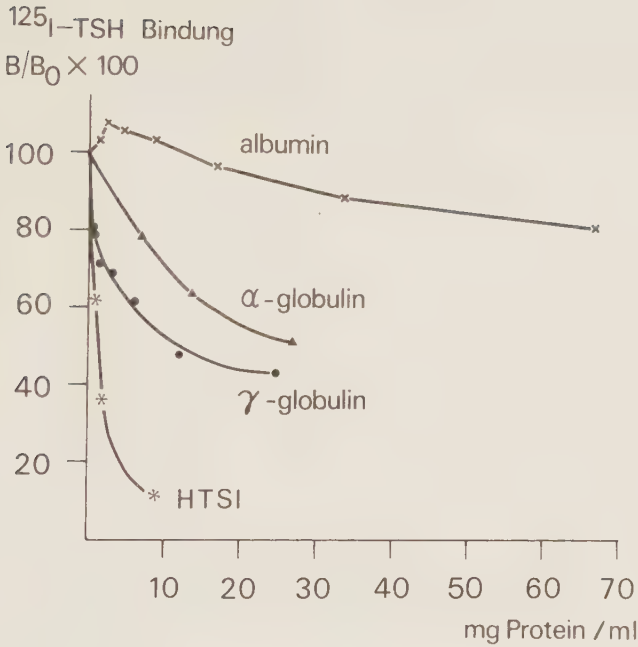


Abb. 12 Dosisabhängige unspezifische Hemmung der Bindung von ^{125}J -TSH an die Schilddrüsenmembranfraktion vom 700 bis 25.000 $\times$ g Sediment durch Proteinfractionen aus Normalserum. Dazu im Vergleich die Hemmung durch HTSI. Die Bindung ohne Protein ist als 100 % gesetzt.

3.10. Untersuchung über die ^{125}J -TSH-Bindung der Membranfraktionen vom 700 x g, 10.00 x g, 25.000 x g und 100.000 x g Sediment

Aus 24 g Schilddrüsengewebe wurden die Membranfraktionen wie unter 2.1.2. aufgearbeitet und der Gesamtproteingehalt der Fraktionen bestimmt. Äquivalente zu 50 μg wurden in 150 μl PPNB mit ^{125}J -TSH (20.000 IpM) bei 37°C für 120 min inkubiert. Kontrollproben enthielten für die unspezifische Bindung 400 mU Thyreostimulin Organon. Nach Zugabe von 1.7 ml kaltem Inkubationspuffer ($0-4^\circ\text{C}$) wurde durch Ultrazentrifugation gebundene von freier Radioaktivität getrennt und die Bindung ausgerechnet.

Membranfraktion		700 xg	10.000 xg	25.000 x g	100.000 x g
Gesamtprotein gehalt	(mg/ml)	306	111	47	70
Gesamt- bindung	$(\frac{\text{B}}{\text{F}} \times 100)$	25.1	34.8	34.2	9.3
unspezi- fische Bindung	$(\frac{\text{B}}{\text{F}} \times 100)$	3.9	6.9	6.6	1.8
spezi- fische Bindung	$(\frac{\text{B}}{\text{F}} \times 100)$	21.9	27.9	27.6	7.5

Mit der Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Membranfraktionen wurde in diesem Versuch noch gezeigt, welche Proteinmenge die einzelnen Membranfraktionen bei einer Aufarbeitung von 24 g Schilddrüsengewebe enthalten. Diese Angaben sind nicht in Abb. 13 berücksichtigt.

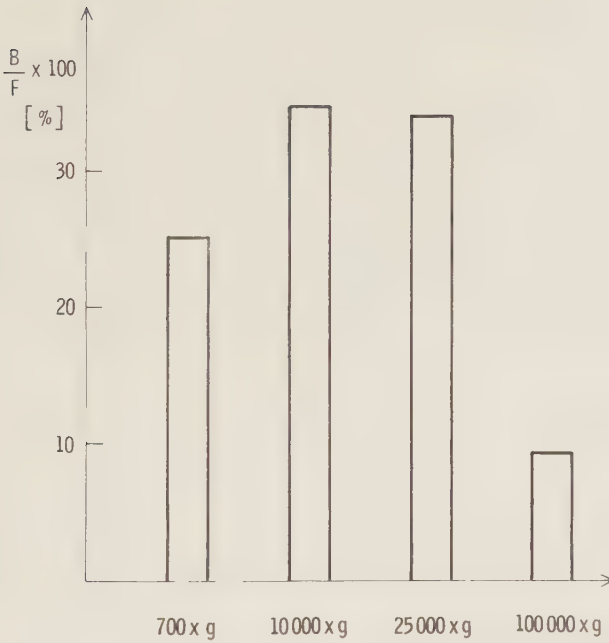


Abb. 13 Bindungsfähigkeit verschiedener Membranfraktionen:
Bindung von ^{125}J -TSH an Membranfraktionen, die durch
verschiedene Sedimentationsraten von 700 x g,
10.000 x g, 25.000 x g und 100.000 x g von Schilddrü-
senhomogenisat gewonnen wurden. Die Ordinate zeigt die
spezifische Bindung $\frac{B}{F} \times 100$.

3.11. TSH-Standardkurven für verschiedene Membranfraktionen zur Bestimmung der Empfindlichkeit des RRA-Systems

In dieser Versuchsreihe wurden Schilddrüsenmembranen vom 700 x g-, 700 - 10.000 x g- und 10.000 - 25.000 x g-Sediment zu je 50 μ l (1 mg Protein/ml) mit verschiedenen hohen Dosen von 11.3 bis 1.000 μ U unmarkiertem TSH für 20 min bei 37°C vor-inkubiert. Mit 125 J-TSH, jodiert nach der Methode von Hunter und Greenwood, wurde für weitere 45 min inkubiert. Nach Zugabe von kaltem Inkubationspuffer wurde durch Ultrazentrifugation bei 50.000 UpM für 60 min gebundenes von freiem 125 J-TSH getrennt, die Radioaktivität gemessen und die Gesamtbindung bestimmt.

TSH un-								
markiert	(μ U/Ver-	0	10	50	100	200	500	1.000
	suchs-							
	ansatz							

700 x g Sediment:

Gesamt-	($\frac{B}{F} \times 100$)	20.0	20.9	20.8	18.1	17.6	18.0	12.6
bindung		20.4	-	19.3	15.3	15.3	-	15.0

700 - 10.000 x g Sediment:

Gesamt-	($\frac{B}{F} \times 100$)	21.8	22.0	22.0	20.9	19.6	18.1	16.2
bindung		22.2	-	22.6	21.4	19.8	17.7	16.0

10.000 - 25.000 x g Sediment:

Gesamt-	($\frac{B}{F} \times 100$)	22.2	21.9	22.0	21.1	18.6	16.9	15.4
bindung		21.8	-	22.3	20.5	18.8	16.7	-

Die Empfindlichkeit des RRA-Systems wurde gemessen an dem Einsatz von unmarkiertem TSH, der die Bindung von 125 J-TSH an die Membranen hemmt. Sie lag bei allen drei Membranfraktionen über 100 μ U TSH.

Die Membranen vom 700 x g Sediment hatten sehr unterschiedliche Bindung in den Duplikaten.

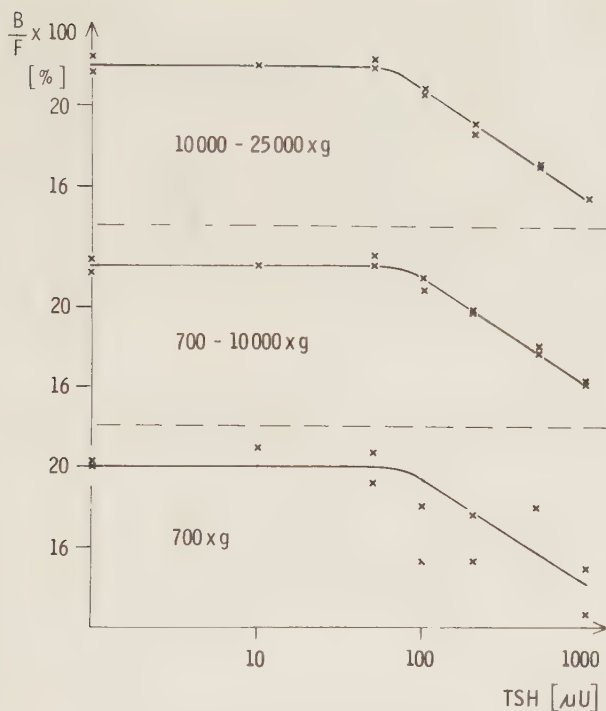


Abb. 14 Standardkurve für TSH bei verschiedenen Membranfraktionen. Von den Membranfraktionen wurden je 50 μl Protein pro Probe mit zunehmenden Konzentrationen Thyreostimulin (Abszisse) und ^{125}J -TSH inkubiert, zentrifugiert und die Radioaktivität im Sediment (B) und im Überstand (F) gemessen (Ordinate).

3.12. Vergleich zwischen der Empfindlichkeit des RRA-Systems mit Membranen von 700 - 25.000 x g Sediment und den angereicherten Membranen durch dosisabhängige Bindungshemmung mit unmarkiertem TSH

Beide Membranfraktionen wurden wie im vorausgehenden Versuch (3.11.) zuerst mit Verdünnungen von unmarkiertem TSH (Thyreostimulin Organon) vorinkubiert und mit ^{125}J -TSH, jodiert nach der Methode von Hunter und Greenwood, inkubiert.

Gebundenes (B) wurde von freiem (F) ^{125}J -TSH getrennt und die Gesamtbindung bestimmt.

TSH unmarkiert	Ver- ($\mu\text{U/suchs-}$) ansatz	0	10	50	100	200	500	1.000
----------------	--	---	----	----	-----	-----	-----	-------

700 - 25.000 x g Sediment

Gesamt- bindung	($\frac{B}{F} \times 100$)	28.6	28.5	28.2	27.6	26.1	24.0	22.5
		27.7	27.9	29.0	28.2	25.6	24.9	23.1

angereicherte Membranen

Gesamt- bindung	($\frac{B}{F} \times 100$)	33.3	32.5	33.5	31.4	30.6	26.2	25.0
		32.5	33.4	32.2	31.9	30.1	27.1	23.9

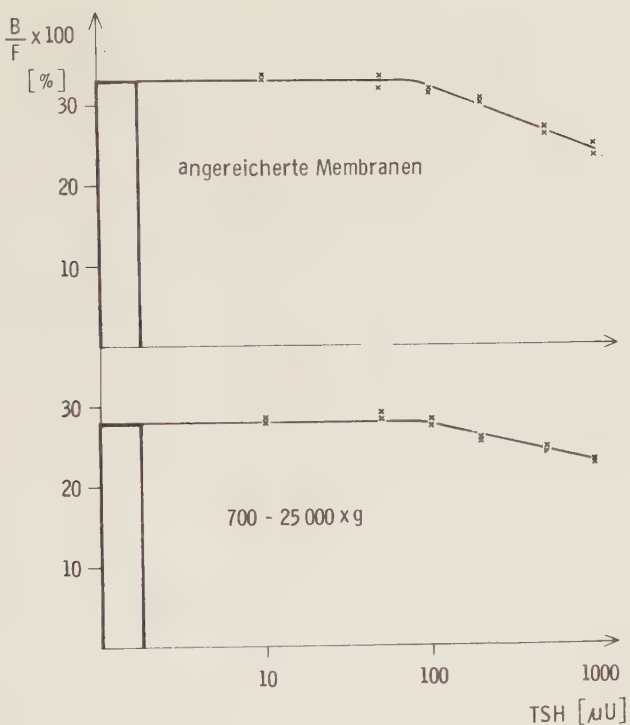


Abb. 15 Standardkurve für TSH mit:

1. über einen Saccharosegradienten angereicherte Membranen.
2. Membranen vom 700 - 25.000 xg Sediment.

Der Beginn der Hemmung durch unmarkiertes TSH zeigt die Empfindlichkeit des RRA.

3.13. Jodierung von TSH nach der Methode von Hunter und Greenwood

Nach der Methode von Hunter und Greenwood in der Modifikation nach Mehdi wurden 4 µg hochgereinigtes TSH vom Schwein mit 1 mCi ^{125}J odid angesetzt. Mit 5 µg Chloramin-T wurde die Reaktion bei Zimmertemperatur gestartet und nach 30 sec mit 15 µg Natriummetabisulfit beendet. Durch Säulenchromatographie mit Sephadex G-50 wurde ^{125}J -TSH und freies $^{125}\text{J}^-$ getrennt. Von 0.5 ml Fraktionen wurde mit 10 µl Proben die Radioaktivität gemessen und in einem Elutionsdiagramm aufgetragen. Der Transfer des $^{125}\text{J}^-$ an TSH gebunden wurde in Prozent angegeben, bezogen auf die Gesamtradioaktivität des ^{125}J -TSH-Peaks und des freien ^{125}J -Peaks.

In den Fraktionen 8 - 13 befand sich das an TSH gebundene ^{125}J mit einer Radioaktivität von 321.993 IpM. Der zweite Radioaktivitätsanstieg von Fraktion 20 - 27 mit 416.486 IpM enthält das ungebundene $^{125}\text{J}^-$.

$$\text{Transfer} = \frac{\sum_{i=8}^{13} \text{IpM}_{\text{Fi}}}{\sum_{i=8}^{13} \text{IpM}_{\text{Fi}} + \sum_{i=20}^{27} \text{IpM}_{\text{Fi}}} \times 100 = \frac{321993 \text{ IpM}}{738479 \text{ IpM}} \times 100 = 43.6 \%$$

Die spezifische Aktivität gibt die Radioaktivität pro Mikrogramm TSH an. Man erhält sie aus dem Transfer von der eingesetzten Radioaktivität, 1 mCi ^{125}J odid, in Bezug auf die eingesetzte TSH-Menge.

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\text{Transfer} \times \text{eingesetzte Radioaktivität}}{100 \times \text{eingesetztem TSH}}$$

$$= \frac{43.6 \times 1000 \mu\text{Ci}}{100 \times 4 \mu\text{g TSH}} = 109.0 \mu\text{Ci}/\mu\text{g TSH}$$

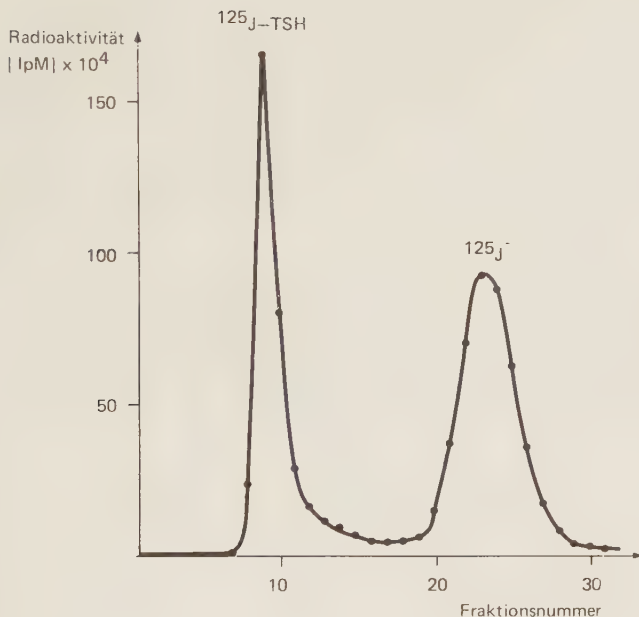


Abb. 16 Nach der Jodierungsmethode von Hunter und Greenwood wurden 4 μg hochgereinigtes TSH vom Schwein mit 1 mCi ^{125}J Jodid markiert. Säulenchromatographie mit Sephadex G-50 trennt ^{125}J -TSH in Fraktion 8 - 13 und $^{125}\text{J}^-$ in Fraktion 20 - 27. Die Radioaktivität wurde in Impulse pro Minute (IpM) gemessen und auf der Ordinate aufgetragen.

3.14. Rechromatographie von ^{125}J -TSH

Zur Rechromatographie wurden die ^{125}J -TSH-Fraktionen mit einer Radioaktivität von über 100.000 IpM auf eine Sephadex G-50 Säule gegeben. Es wurden Fraktionen von 0.5 ml gesammelt und die Radioaktivität von 10 μl Proben bestimmt. In den Fraktionen vom ersten Radioaktivitätsanstieg befand sich das ^{125}J -TSH (Fraktion 7 - 11), das freie dissoziierte $^{125}\text{J}^-$ befand sich in den Fraktionen 22 - 27 mit dem zweiten Radioaktivitätsanstieg.

Rechromatographiert wurde ^{125}J -TSH, das älter als eine Woche war. Es wurde versucht, durch die Eliminierung von dissoziiertem $^{125}\text{J}^-$ das ^{125}J -TSH zu reinigen. Trotzdem blieb die Bindung danach in 3 Versuchen niedrig und inkonstant. Die biologische Aktivität von diesem ^{125}J -TSH war für den RRA schon zu niedrig.

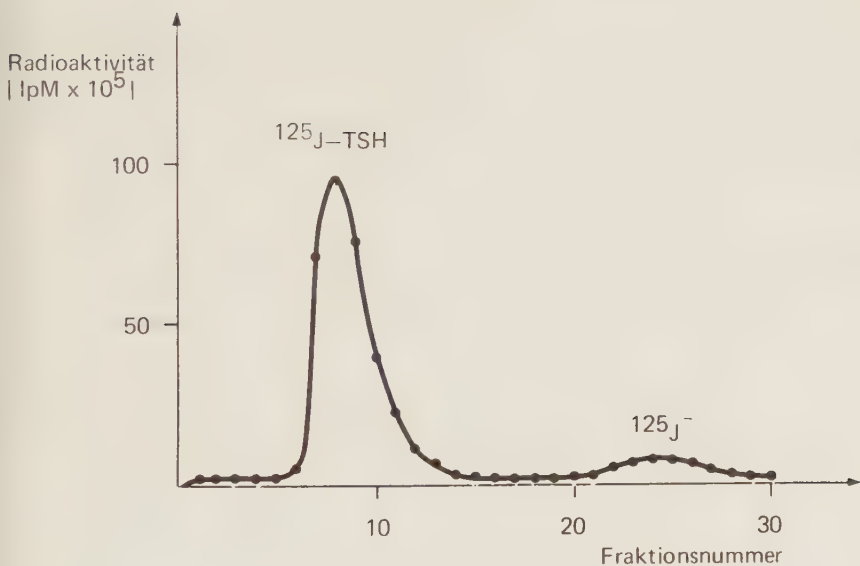


Abb. 17 Rechromatographie von $^{125}\text{J-TSH}$:
Markiertes TSH älter als eine Woche wird durch erneute Chromatographie über eine Sephadex G-50 Säule vom dissoziierten $^{125}\text{J}^-$ getrennt. Dieses befand sich in dem zweiten Peak in Fraktion 21 - 28.

3.15. Chromatographie von ^{125}J -TSH mit Sephadex G-100 superfine und die Bindungsfähigkeit der gewonnenen Fraktionen

Für den Versuch, durch weitere Chromatographie die ^{125}J -TSH Fraktionen von TSH-Untereinheiten zu reinigen, wurden die Fraktionen mit ^{125}J -TSH aus der Jodierung nach Hunter und Greenwood auf eine Säule mit Sephadex G-100 superfine mit den Maßen 1,2 cm x 70 cm gegeben. Es wurden Fraktionen von 1.2 ml gesammelt und deren Radioaktivität aus 10 μl Proben bestimmt.

Diese Chromatographie ergab nur eine geringe Aufspaltung des radioaktiven Materials. ^{125}J -TSH war in den Fraktionen 29 - 64 als einheitlicher "Peak" enthalten. In den Fraktionen 78 - 83 befand sich eine geringgradige Erhöhung der Radioaktivität durch dissoziiertes ^{125}J .

In Bindungsstudien wurde die Bindungsfähigkeit der Fraktionen 35 - 81 untersucht. 10.000 IpM jeder Fraktion wurden mit 200 μg Membranproteinen für 45 min bei 37°C inkubiert. Kontrollproben enthielten unmarkiertes TSH im Überschuß. Nach Ultrazentrifugation wurde aus Sediment und Überstand unter Berücksichtigung der unspezifischen Bindung die spezifische Bindung ausgerechnet.

Das Bindungsmaximum mit der Fraktion 67 wurde als 100 % gesetzt. Dieses lag deutlich hinter dem ^{125}J -TSH-Peak, der in der Fraktion 50 seinen Höchstwert hatte. Mit den Fraktionen des ^{125}J -TSH-Peaks betrug die Bindung nur 34 % vom Bindungsmaximum in der Fraktion 67.

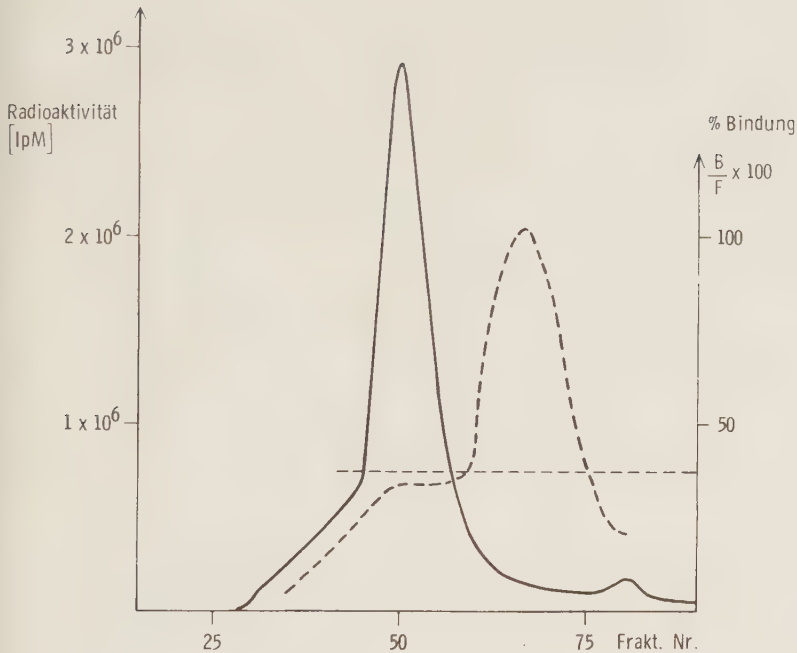


Abb. 18 Chromatographie von $^{125}\text{J-TSH}$ über Sephadex G-100 superfine:
Die Chromatographie über eine Sephadex G-100 superfine Säule zeigte keine weitere Auftrennung des $^{125}\text{J-TSH}$ -Peaks bei Fraktion 50 (durchgezogene Linie). Die Bindungsaktivität von $^{125}\text{J-TSH}$ an Membranen vom 700 - 25.000 x g Sediment stieg jedoch noch nach dem TSH-Peak auf 100 % an (gestrichelte Linie).

3.16. Nachreinigung des $^{125}\text{J-TSH}$ mit der Absorptionsmethode nach Smith und Hall

150 μl der $^{125}\text{J-TSH}$ -Lösung jodiert nach der Methode nach Hunter und Greenwood wurden mit den dafür aufgearbeiteten Bindungsmembranen bei 37°C für 30 min inkubiert. Danach wurde mit 50.000 UpM bei $0 - 4^\circ\text{C}$ zentrifugiert (Überstand I). Nach weiteren zwei Waschvorgängen mit Inkubationspuffer (Überstand II + III) wurde das wieder suspensierte Sediment mit 2 M NaCl-Lösung (NaCl-Membransuspension) für 30 min bei $0 - 4^\circ\text{C}$ inkubiert. Dadurch wurde ein Teil des $^{125}\text{J-TSH}$ von den Membranen wieder getrennt.

Nach Zentrifugieren mit 50.000 UpM wurde der Überstand (4.7 ml) auf eine Säule mit Sephadex G-100 gegeben (Überstand IV). Es wurden 0.5 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen mit dem TSH-Peak Nr. 31 - 40 wurden vereinigt und bei -70°C eingefroren. Dieses nachgereinigte $^{125}\text{J-TSH}$ war für etwa 2 Wochen ausreichend biologisch aktiv.

Um zu zeigen, wieviel Radioaktivität an Bindungsmembranen gebunden und wieviel durch 2 M NaCl wieder gelöst werden konnte, wurde von den Überständen I - IV und der NaCl-Membransuspension 20 μl -Proben entnommen und deren Radioaktivität im Packard- γ -Strahlen-Zähler gemessen.

Überstand I	347.9	$\text{IpM} \times 10^3$	32 ml	11134.8	$\text{IpM} \times 10^6$
Überstand II	22.8	$\text{IpM} \times 10^3$	31 ml	707.2	$\text{IpM} \times 10^6$
Überstand III	7.3	$\text{IpM} \times 10^3$	32 ml	234.4	$\text{IpM} \times 10^6$
NaCl-Membran-suspension	270.9	$\text{IpM} \times 10^3$	5 ml	1354.3	$\text{IpM} \times 10^6$
eingesetzte Radioaktivität				13430.8	$\text{IpM} \times 10^6$
Überstand IV	105.6	$\text{IpM} \times 10^3$	4.7 ml	496.3	$\text{IpM} \times 10^6$

Unter Berücksichtigung der Mengenverhältnisse wurde die eingesetzte Radioaktivität bestimmt. Sie betrug $13430.8 \text{ IpM} \times 10^6$. Nach den Waschvorgängen waren an die Bindungsmembranen 10.1 % mit $1354.3 \text{ IpM} \times 10^6$ gebunden. Davon konnten durch Inkubation in 2 M NaCl-Lösung wieder 36.6 % mit $496.3 \text{ IpM} \times 10^6$ gelöst werden. Bezogen auf die eingesetzte Radioaktivität betrug dieser Anteil 3.7 %.

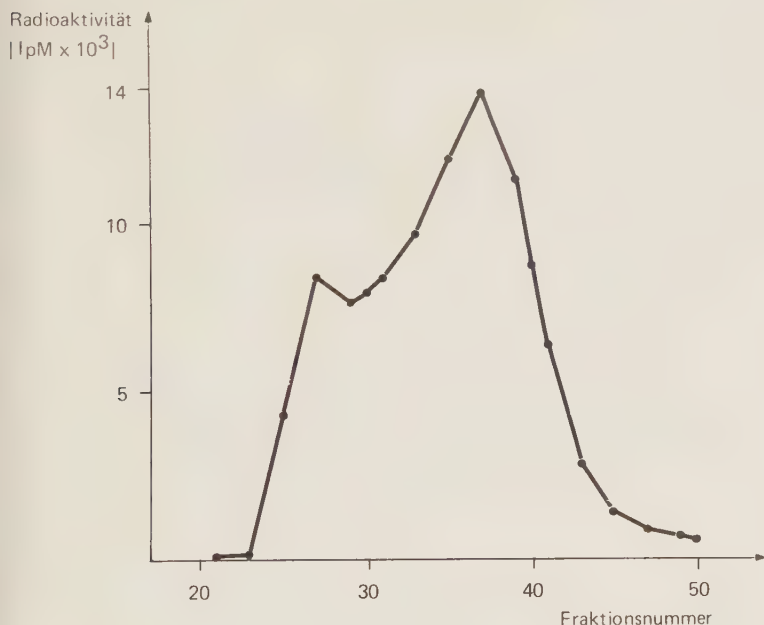


Abb. 19 Nachreinigung von ^{125}J -TSH nach der Methode von Smith und Hall:
Von den Bindungsmembranen wieder gelöstes ^{125}J -TSH wurde über eine Sephadex G-100 Säule chromatographiert und in 0.5 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen 31 - 40 mit der höchsten gemessenen Radioaktivität von ^{125}J -TSH wurden für den RRA verwendet.

3.17. Vergleich zwischen der Empfindlichkeit in der Bindung von:

1. $^{125}\text{J-TSH}$ jodiert nach der Methode nach Hunter und Greenwood.
2. $^{125}\text{J-TSH}$ nachgereinigt nach der Methode nach Smith und Hall an Schilddrüsenmembranen unter dem Einfluß von verschiedenen Konzentrationen von unmarkiertem TSH

Von Membranen vom 10.000 - 25.000 x g Sediment wurden 50 µl (1 mg Protein/ml) mit verschiedenen hohen Dosen unmarkiertem TSH mit 0, 5, 10, 50, 100 und 1.000 µU und mit $^{125}\text{J-TSH}$ für 45 min inkubiert. Das markierte TSH war nach der Methode nach Hunter und Greenwood jodiert worden.

Eine zweite Versuchsreihe wurde mit denselben Verdünnungen von unmarkiertem TSH und mit $^{125}\text{J-TSH}$ inkubiert, das nach der Methode nach Smith und Hall nachgereinigt worden war.

Die Inkubationszeit wurde mit Zugabe von kaltem (0 - 4°C) Inkubationspuffer beendet. Es wurde an Membranen gebundenes $^{125}\text{J-TSH}$ durch Ultrazentrifugation bei 50.000 UpM sedimentiert, der Überstand wurde verworfen. Die Bindung wurde aus gebundenem $^{125}\text{J-TSH}$ (B) pro totalem $^{125}\text{J-TSH}$ (T) bestimmt.

$$\text{Bindung} = \frac{B}{T} \times 100.$$

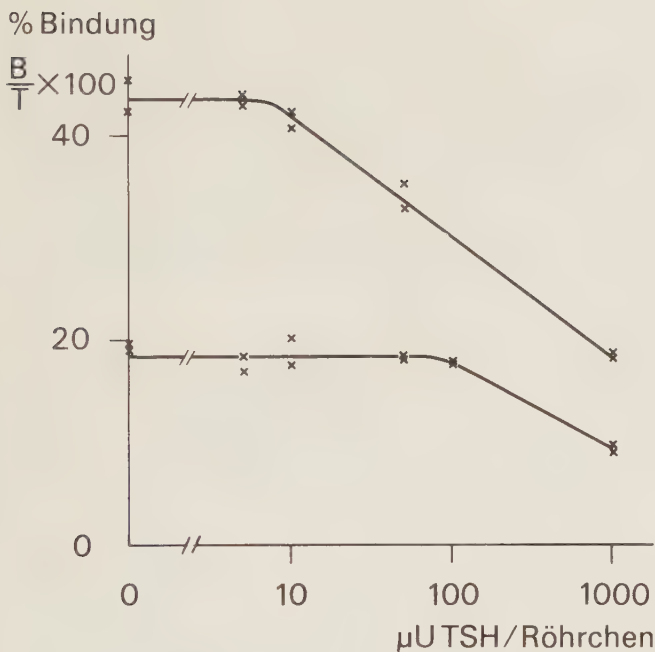
Unmar- kiertes TSH	Ver- (µU/suchs-) ansatz	0	5	10	50	100	1.000
--------------------------	-------------------------------	---	---	----	----	-----	-------

$^{125}\text{J-TSH}$ (Hunter und Greenwood)

Gesamt- bindung	($\frac{B}{T} \times 100$)	19.6	18.2	20.2	18.5	18.0	9.8
		19.0	16.6	17.4	18.0	17.5	8.7

$^{125}\text{J-TSH}$ (Smith und Hall)

Gesamt- bindung	($\frac{B}{T} \times 100$)	45.4	43.9	42.4	35.2	30.8	18.9
		42.4	43.2	40.6	32.6	29.0	18.2



- Abb. 20 1. Bindung von ^{125}J -TSH an das 700 - 25.000 x g Sediment aus Schilddrüsenhomogenisat mit ^{125}J -TSH ohne Nachreinigung (untere Kurve) und nach Nachreinigung nach der Methode von Smith und Hall (obere Kurve).
2. Der Einfluß von steigenden Mengen von TSH auf die Bindung. Die Empfindlichkeit des RRA liegt in dem Versuch mit nachgereinigtem ^{125}J -TSH bei 10 μU TSH. Die Bindung wurde in $\frac{B}{T} \times 100$ gemessen (Ordinate).

4. Diskussion

Adams und Purves (1) stellten als erste - in einem Meerschweinchen-Bioassay für die Bestimmung von TSH - fest, daß in einigen Seren von Morbus Basedow-Patienten ein Faktor vorhanden ist, der die Schilddrüse dieser Meerschweinchen im Vergleich zu TSH verzögert stimulierte. Zum Nachweis dieses Faktors, LATS genannt, entwickelte McKenzie den vereinfachten Mäuse-Bioassay (43). LATS konnte jedoch nur in ca. 20% der untersuchten Basedow-Seren nachgewiesen werden (Schleusener, 73; Geißler, 28). Die Ursache für die niedrige Nachweisrate sah man einerseits in der ungenügenden Empfindlichkeit dieses Systems, die bei 200 μ U TSH/Versuchsansatz lag und andererseits in der geringen Affinität der menschlichen thyreotropen Immunglobuline zu den Membranrezeptoren der Mäuseschilddrüsen (Carneiro et al., 23; Chopra et al., 24; McKenzie et al., 49; Lipman et al., 39; Wong et al., 83).

Adams und Kennedy (6) hatten 1967 auf die Existenz von thyreotropen Immunglobulinen mit hoher Affinität zu menschlichen Schilddrüsen hingewiesen, die im McKenzie-Versuch nicht nachweisbar gewesen waren. Aufgrund ihrer Nachweismethode hatten sie diesem Immunglobulin den Namen LATS-Protector gegeben.

Mit der Entwicklung des Radioliganden-Rezeptoren-Assay 1974 durch die beiden Arbeitsgruppen Mehdi und Nussey (53, 54) sowie Smith und Hall (69, 70) konnte zum ersten Mal direkt menschliches thyreotropes IgG über die Inhibition der Bindung von radioaktiv-markiertem TSH an menschliche Schilddrüsen nachgewiesen werden. Die Empfindlichkeit des Versuches nach der Methode von Mehdi und Nussey lag dabei bei 100 bis 200 μ U TSH/Versuchsansatz (54), während Smith und Hall eine bedeutend bessere Empfindlichkeit von 10 μ U TSH/Versuchsansatz angaben (70).

Wesentlich für die Empfindlichkeit eines kompetitiven Bindungsassays ist:

1. Die Affinität des Hormons zum Rezeptor und damit die Aufarbeitung des Rezeptors.
2. Das markierte Hormon mit möglichst hoher spezifischer Radioaktivität unter Erhaltung der biologischen Aktivität.
3. Die unspezifischen Einflüsse von Bestandteilen des Inkubationsmediums und die Inkubationsbedingungen (Temperatur, Zeit, pH).

Die Ergebnisse der zu diesen Punkten durchgeführten Untersuchungen sollen im folgenden diskutiert werden.

In den Versuchen über den Nachweis von HTSI in Morbus Basedow-Seren mit dem RRA nach der Methode von Mehdi und Nussey (54) zeigten sich zunächst folgende Schwierigkeiten:

Die spezifische Bindung von TSH an Schilddrüsenmembranen variierte von Versuch zu Versuch stark und lag oft so niedrig, daß eine Bindungshemmung durch aktives HTSI nicht immer eindeutig nachgewiesen werden konnte. Eine Ursache für die inkonstanten Bindungsergebnisse dürfte in der unterschiedlichen Eignung des Schilddrüsenoperationsmaterials liegen. Diese beruht auf dem verschieden hohen Bindegewebsanteil des menschlichen Schilddrüsenmaterial. Einen niedrigeren Bindegewebsanteil besitzen zwar Schweine- und Rinderschilddrüsen, weshalb schonendere Methoden bei der Homogenisierung möglich wären. Für den Nachweis von HTSI können diese aber nicht verwendet werden, da die Artspezifität bei diesem Test eine entscheidende Rolle spielt. Tierische Schilddrüsenmembranen könnten jedoch für einen RRA für das thyreotrope Hormon des Hypophysenvorderlappens eingesetzt werden, da für die biologische TSH-Aktivität keine strenge Artspezifität besteht. (Prof. Lissitzky, persönliche Mitteilungen; Moore et al., 56). Mehdi arbeitete in seinen Versuchen mit den angereicherten Membranen, die er aus dem

1.000 g x Überstand durch Zentrifugation über einen Saccharose-Gradienten gewonnen hatte. Unsere weiterführenden Untersuchungen über die ^{125}J -TSH-Bindung an verschiedene subzelluläre Membranfraktionen vom 700 x g, 10.000 x g, 25.000 x g und 100.000 x g Sediment zeigten, daß das 700 x g Sediment eine ausreichende Bindung hatte. Am niedrigsten lag die Bindung des 100.000 x g Sediments. Die höchsten spezifischen Bindungen fanden wir in den Versuchen mit dem 10.000 x g und dem 25.000 x g Sediment (3.10.). Die dosisabhängige Hemmung der Bindung durch unmarkiertes TSH zeigte für die 10.000 x g und 25.000 x g Membranfraktion ähnlich gute Ergebnisse (3.11.). In dem Versuch mit der 700 x g Fraktion erhielten wir stark abweichende Resultate in den Duplikaten, was sicher auf den stark variierenden Bindegewebsanteil dieser Membranfraktion zurückzuführen ist. Deshalb schied diese Membranfraktion für die Verwendung im RRA aus.

Eine Anreicherung der Membranfragmente durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation führte zwar zu einem Anstieg der spezifischen Bindung von 22 % auf 33 % $\frac{\text{B}}{\text{F}}$, aber es konnte mit diesen angereicherten Membranen keine Verbesserung in der Empfindlichkeit erreicht werden (3.12.).

Die Empfindlichkeit lag bei allen Membranfraktionen bei ca. 100 μU TSH/Versuchsansatz.

Vergleichende Enzymstudien über die spezifische Aktivität der 5' Nukleotidase und der Adenylcyclase in den verschiedenen Membranfraktionen zeigten unseren Versuchen entsprechende Resultate für die Adenylcyclase. In der 25.000 x g Membranfraktion wurde die höchste und in der 100.000 x g Fraktion die niedrigste Enzymaktivität gemessen. Dagegen stieg die spezifische Aktivität der 5'Nukleotidase von der 700 x g bis zur 100.000 x g Membranfraktion an. Bei den angereicherten Membranen entsprach der 2fache Anstieg der durch TSH stimulierten

Adenylcyclaseaktivität etwa dem 11%igen Anstieg der spezifischen Bindung im RRA (Abb. 21, 22, 23), (Kotulla et al., 36).

Aufgrund dieser Ergebnisse erwies sich für den RRA die 700 x g bis 25.000 x g Membranfraktion als am besten geeignet, da mit diesen Membranen konstant ausreichend hohe Bindungen erzielt wurden und sie sich zudem wegen ihrer einfachen und schnelleren Aufarbeitung für Routineuntersuchungen besser eigneten.

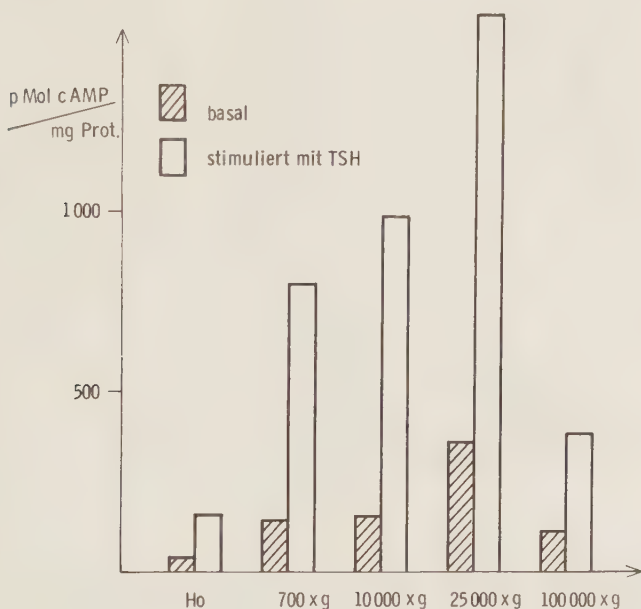


Abb. 21 Spezifische Aktivität der Adenylcyclase in subzellulären Fraktionen aus Schilddrüsenhomogenisat. Die schraffierten Säulen zeigen die Basalaktivität, die weißen Säulen zeigen die Aktivität unter Stimulierung mit TSH (200 mU/ml).

Mit freundlicher Genehmigung durch E. Eiselen
- Promotionsarbeit in Vorbereitung.

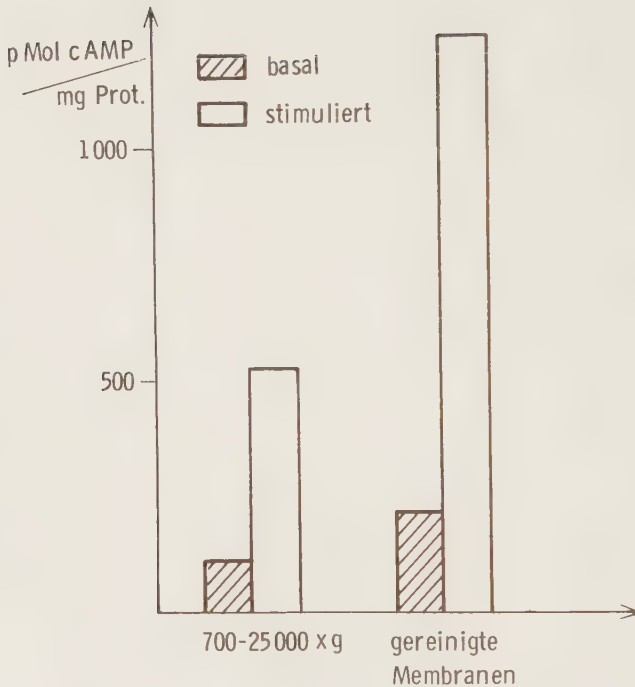


Abb. 22 Spezifische Aktivität der Adenylcyclase im 700 bis 25.000 x g Sediment aus Schilddrüsenhomogenisat und einer daraus durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen reineren Membranfraktion, den sogenannten angereicherten Membranen. Die schraffierten Säulen zeigen die Basalaktivität, die weißen Säulen die Aktivität unter Stimulierung mit TSH (200 mU/ml).

Mit freundlicher Genehmigung durch E. Eiselen
- Promotionsarbeit in Vorbereitung.

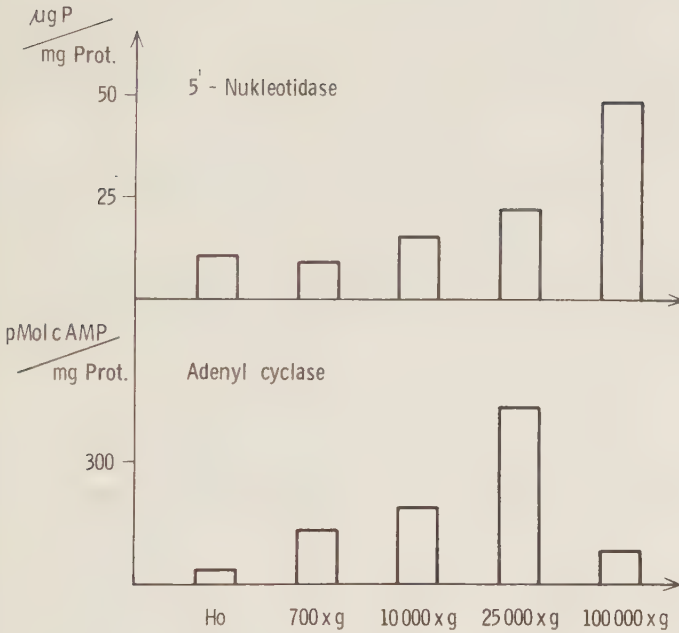


Abb. 23 Spezifische Aktivität der 5'-Nukleotidase und der Adenylcyclase in den verschiedenen Membranfraktionen. Ho = Homogenisat.

Mit freundlicher Genehmigung durch E. Eiselen
- Promotionsarbeit in Vorbereitung.

Die Empfindlichkeit des RRA hängt wesentlich von der spezifischen Radioaktivität des thyreotropen Hormons ab. Eine höhere spezifische Radioaktivität könnte man durch Verlängerung der Oxidationszeit oder durch höheren Einsatz von Oxidationsmittel (Chloramin T) beim Markierungsvorgang erhalten. Das Hormon wird aber durch das Oxidationsmittel bei der Markierung geschädigt. Dadurch wird die biologische Aktivität des Hormons vermindert, was wiederum die Empfindlichkeit des RRA herabsetzt. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß durch die γ -Strahlung des ^{125}J ebenfalls die Bildung von Radikalen begünstigt wird und somit während der Aufbewahrungszeit die biologische Aktivität zerstört wird.

Wie die Tabelle 1 zeigt, steigt mit längerer Oxidationszeit und höherem Chloramin-T-Einsatz die spezifische Aktivität an.

Tabelle 1

Chloramin-T (μg)	Spezifische Aktivität ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ TSH) bei 30 sec Oxidations- zeit	Spezifische Aktivität ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ TSH) bei 60 sec Oxidations- zeit
10.0	268	-
7.5	204	-
5.0	69	110

Bei einer spezifischen Aktivität von 60 - 80 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ TSH fanden wir schon eine deutliche Abnahme der biologischen Aktivität, so daß die Oxidationszeit auf 30 sec und die Chloramin-T-Konzentration auf 5 μg begrenzt werden mußte.

Der weitere Versuch (3.15.), über eine zweite Chromatografie des markierten Hormons das reine biologisch aktive Hormon zu gewinnen, ergab eine so niedrige Ausbeute an markierter "Substanz" mit höherer Bindungsfähigkeit, daß diese Methode für eine Anwendung in der Routine nicht in Frage kam. Deshalb ließen wir die Frage offen, ob es sich bei dieser Substanz um reines markiertes Hormon handelt und nicht etwa um TSH-Fragmente mit einer niedrigeren Wandergeschwindigkeit.

Mit der Nachreinigungsmethode nach Smith et al. (69) ergab sich zum ersten Mal die Möglichkeit, ein ausreichend biologisch aktives TSH zu gewinnen mit einer auf 110 - 130 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ TSH erhöhten spezifischen Aktivität. Erst bei Werten über 150 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ TSH war das Hormon instabil. Dabei bestand zwar am Tage der Jodierung noch ausreichende biologische Aktivität; diese nahm aber innerhalb der ersten 24 Stunden rapide ab. Dieser Aktivitätsverlust ist durch die Wirkung des eingebauten ^{125}J (γ -Strahler) zu erklären. Das nachgereinigte ^{125}J -TSH mit einer spezifischen Radioaktivität bis zu 150 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ TSH konnte über einen Zeitraum von 14 Tagen mit befriedigenden Ergebnissen in Bindungsstudien verwendet werden.

Durch den Einsatz von diesem markierten TSH mit einer auf das zweieinhalbfach erhöhten spezifischen Radioaktivität konnte die Empfindlichkeit des Assaysystems von 100 μU TSH/Versuchsansatz auf nunmehr 10 μU TSH/Versuchsansatz verbessert werden (3.17.).

In den Untersuchungen über den unspezifischen Einfluß von Salzen im Inkubationsmedium auf die spezifische Bindung zeigte sich, daß schon physiologische NaCl-Konzentrationen von 0.14 M NaCl im Inkubationsmedium eine Hemmung der spezifischen Bindung von 68 % bewirken. Gleichsinnig wird die unspezifische Bindung beeinflusst (3.6).

Mehdi und Nussey (59) beschrieben, daß divalente Kationen wie Ca^{++} und Mg^{++} einen noch stärker hemmenden Einfluß auf die Bindung haben. In Studien über den pH-Einfluß konnte Nussey kein pH-Optimum für das Inkubationsmedium feststellen. Die Bindungsfähigkeit blieb zwischen pH 5,5 und 9,5 konstant.

Die zunehmende TSH-Bindung mit steigender Temperatur (3.4.) zeigt ab etwa 30°C einen verstärkten Anstieg.

Ähnliche Ergebnisse erhielten Moore und Wolff (56), die ebenfalls unspezifische Einflüsse wie pH, Temperatur und Kationen auf die Bindung an Rinderschilddrüsenmembranen untersuchten. Auch bei diesen Membranen kommt es innerhalb weniger Minuten zu einer Sättigung der Bindungsvalenzen. Das Bindungsoptimum lag für diese Membranen bei pH 5,5. Für die Temperatur ergab sich eine kontinuierliche Bindungszunahme bei steigender Temperatur, die erst bei 60°C den Sättigungsbereich erreichte. Der Einfluß der mono- und divalenten Kationen entsprach Mehdis und unseren Ergebnissen. Schon bei Konzentrationen von 5 mM divalenter Kationen kam es zu einer deutlichen Reduzierung der Bindung von markiertem Hormon, während monovalente Kationen wie Na^{+} und K^{+} bei 5 mM nur geringen hemmenden Effekt zeigten.

Die gleichzeitige Bestimmung der Adenylcyclase-Aktivität ergab eine entsprechende Hemmung der Aktivität durch Kationen. Sie schlossen daraus, daß diese hemmenden Einflüsse erst nach der Hormonbindung an den Rezeptor auf das Adenylcyclasesystem wirken.

Manley und Bourke (41) beschrieben ebenfalls den hemmenden Einfluß von monovalenten Kationen im Inkubationsmedium auf die Bindung von TSH an Schilddrüsenmembranen von Meerschweinchen. Sie diskutierten für diesen Effekt einen unspezifischen Einfluß der Ionenstärke im Medium auf die physikalischen Eigenschaften der Membranen.

Eine Erklärung für den Einfluß von Temperatur und Salzen im Inkubationsmedium auf die Bindung von $^{125}\text{J-TSH}$ gaben Bashford et al. (12) in ihren Studien über die Fluidität der Membranlipide. Mit steigender Temperatur stellten sie eine Abnahme der Fluoreszenzpolarisation fest, wobei der Abfall bei über 30°C - entsprechend unseren Bindungsstudien - deutlich größer war als in den unteren Temperaturbereichen. Mit steigender Ionenkonzentration von Na^{+} und Ca^{++} nahm die Fluoreszenzpolarisation zu. Mit der Zunahme der Fluoreszenzpolarisation sank die Fluidität der Membranlipide. Dadurch standen weniger Rezeptorproteine für die Bindung des markierten Hormons zur Verfügung.

Die vergleichenden Untersuchungen zwischen der Bindungshemmung durch HTSI-Serum und durch HTSI-Ammoniumsulfatpräzipitat ergaben, daß für Normalseren die Bindung etwa um 30 % niedriger lag als bei der Verwendung von gefällttem Normal-IgG. Aus diesem Ergebnis schlossen wir, daß die übrigen Serumproteine einen unspezifischen hemmenden Einfluß auf die spezifische Bindung des Hormons haben (3.7.).

Die Versuche über den Einfluß der einzelnen Proteinfractionen des Serums ergaben, daß Albumin in physiologischer Konzentration (4 mg Protein/Versuchsröhrchen) keinen Einfluß auf die Bindungsaktivität hat. Eine deutliche Hemmung der Bindung kommt jedoch durch die Globulinfraktionen zustande, wobei die α - und β -Globuline mit 73 % und 47 % stärker hemmen als die γ -Globuline und die IgG-Fraktion mit jeweils 24 % (3.8.).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden von uns für die Messung der HTSI-Aktivität eine durch Ammoniumsulfatpräzipitat gewonnene angereicherte IgG-Fraktion verwendet, um die hemmenden Effekte der α - und β -Globuline zu vermindern.

Mit den Membranen des 700 - 25.000 x g Sediments führten wir weitere Untersuchungen über den Membraneinsatz (3.5.2.) und die Inkubationszeit (3.3.2.) durch. Dabei zeigte sich, daß

wir ausreichend hohe Bindung schon mit einem Proteineinsatz von 50 μ g und bei einer Inkubationszeit von 45 min erhielten. Eine Vorinkubation mit unmarkiertem TSH erwies sich als nicht notwendig, da es dadurch nicht zu einer signifikanten Erniedrigung der unspezifischen Bindung kam.

In den Untersuchungen unter Verwendung der 1.000 - 25.000 x g Membranfraktion konnten in 54 % der Fälle eine HTSI-Aktivität im Serum von Morbus Basedow-Patienten nachgewiesen werden (Schleusener et al., 75). Mehdi beschrieb 6 positive Resultate von 10 untersuchten Seren. Die 4 negativen waren auch nach 4facher IgG-Konzentration negativ geblieben (Mehdi et al., 54). Diese Ergebnisse standen im Gegensatz zu Untersuchungsreihen mit dem RRA von Mukhtar et al. (57), die in allen 56 Seren von unbehandelten Morbus Basedow-Patienten eine positive HTSI-Aktivität gefunden hatten.

Wir nahmen zunächst an, daß die Diskrepanz zu unseren Ergebnissen auf der besseren Empfindlichkeit des Assay-Systems dieser Arbeitsgruppe beruhte, die von ihnen mit 10 μ U TSH/Versuchsansatz angegeben war.

Nach Modifizierung unseres Assays unter der Verwendung der Nachreinigungsmethode nach Smith et al., erreichten wir ebenfalls eine Empfindlichkeit von 10 μ U TSH/Versuchsansatz. Trotzdem konnte auch jetzt nur in 67 % der untersuchten Fälle eine HTSI-Aktivität gefunden werden (Schleusener et al., 76). In Bezug auf die Korrelation zwischen HTSI-Aktivität und Adenylcyclaseaktivität existieren ebenfalls unterschiedliche Angaben. Kendall und Taylor (31) stellten eine Stimulierung der Adenylcyclase durch LATS und TSH fest, nicht aber durch den LATS-Protector. Mukhtar et al. (57) berichteten, daß in 11 von 17 Fällen eine Stimulierung der Adenylcyclase durch Basedow-IgG gefunden wurde. Orgiazzi et al. (61) fanden eine Stimulierung nur in 9 von 15 untersuchten Basedow-Seren.

Für diese Untersuchungen verwendeten diese Autoren Schilddrüsenhomogenisate. Es ist deshalb möglich, daß durch den Homogenisierungsprozeß das Rezeptor-Transducer-Adenylcyclase-System geschädigt wurde. McKenzie und Zakarija (51), die für ihre Untersuchungen Schnitte von Schilddrüsenngewebe verwendeten, berichteten von einer Adenylcyclasestimulation in den IgG-Fractionen aller 20 Patienten, die von ihnen untersucht wurden. Eine mögliche Erklärung für die negativen HTSI-Teste in unserem Versuchsprogramm wäre, daß diese Patienten einen so niedrigen HTSI-Spiegel haben, der im Assay nicht mehr meßbar ist, aber noch ausreichend die Adenylcyclase stimulieren kann.

Letztlich ist noch nicht geklärt, ob die thyreotropen Antikörper für die Auslösung des Morbus Basedow verantwortlich sind, oder ob nicht primär zelluläre immunologische Vorgänge eine Rolle spielen, die erst sekundär eine Bindung von humoralen Antikörpern induzieren (Lamki et al., 37; Munro et al., 58; Volpé et al., 77, 78).

Als Bestimmungsmethode für TSH im Serum ist die Empfindlichkeit des RRA mit 10 μ U TSH/Versuchsansatz noch nicht ausreichend, da die basalen TSH-Spiegel im Radioimmunoassay zwischen 0.5 und 3.8 μ U/ml liegen (Erhardt et al., 27).

5. Zusammenfassung

Das thyreotrope Immunglobulin G, genannt HTSI, kann seit 1974 mit dem Radioliganden-Rezeptoren-Assay, der von den Arbeitsgruppen Mehdi et al. (53, 54) und Smith und Hall (69, 70) entwickelt wurde, nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurde die Verwendungsmöglichkeit des RRA für Routineuntersuchungen zum Nachweis von HTSI und von physiologischen TSH-Konzentrationen untersucht.

Dabei bestanden zunächst die Schwierigkeiten, daß der RRA nach der Methode von Mehdi eine niedrige Empfindlichkeit hatte und die Untersuchungsergebnisse große Schwankungen aufwiesen.

Mit den angereicherten Membranen nach Mehdi untersuchten wir zunächst die unspezifischen Einflüsse des Inkubationsmediums wie Temperatur, Inkubationszeit, Proteineinsatz und Salze auf die ^{125}J -TSH-Bindung.

Durch Modifikation der Membranaufarbeitung unter Verwendung des 700 - 25.000 x g Sediments konnte die Aufarbeitung des Membranmaterials schonender durchgeführt und vereinfacht werden. Wir erhielten ausreichend hohe und konstante spezifische Bindungsergebnisse.

Desweiteren konnten wir den hemmenden Einfluß der α und β -Globulinfraktion der Serumproteine nachweisen. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Vorversuche erhielten wir aber keine entscheidende Verbesserung in der Empfindlichkeit.

Nach Modifikation des Markierungsprozesses von ^{125}J -TSH mit der Nachreinigungsmethode nach Smith gelang es, die Empfindlichkeit des Assaysystems von 100 uU auf 10 μU TSH/Versuchsansatz zu verbessern. In den klinischen Untersuchungen konnte nun HTSI in 67 % der untersuchten Morbus Basedow-Seren nachgewiesen werden (gegenüber 54 % im RRA vor Modifikation

und 19 % im McKenzie-Assay). Die Diskrepanz unserer Ergebnisse zu denen von Mukhtar et al. (57) - mit einem Nachweis von HTSI in 100 % der untersuchten Fälle bei gleicher Empfindlichkeit des Assays - bleibt ungeklärt.

Für den Nachweis von TSH im Serum reicht die Empfindlichkeit des RRA noch nicht aus, da der Normbereich für die basalen TSH-Spiegel im Serum zwischen 0.5 und 3.8 $\mu\text{U/ml}$ im Radioimmunoassay angegeben wird.

6. Literaturzeichnis

1. Adams, D.D. und H.D. Purves:
Abnormal Responses in the Assay of Thyrotropin.
Proc. Univ. Otago Med. School 34, 11 (1956)
2. Adams, D.D.:
The Presence of an Abnormal Thyroid-Stimulating-
Hormone in the Serum of Some Thyrotoxic Patients.
J. Clin. Endocr. 18, 699 (1958)
3. Adams, D.D., T.H. Kennedy, H.D. Purves und N.E. Sirett:
Failure of TSH antisera to neutralize long-acting
thyroid stimulator.
Endocr. 70, 801 (1962)
4. Adams, D.D. und T.H. Kennedy:
Association of long-acting thyroid stimulator with
the gamma globulin fraction of serum.
Proc. Univ. Otago Med. School 40, 6 (1962)
5. Adams, D.D.:
Pathogenesis of the hyperthyroidism of Graves'disease.
Brit. Med. J. 1, 1015 (1965)
6. Adams, D.D. und T.H. Kennedy:
Occurrence in Thyrotoxicosis of a Gamma Globulin
which Protects LATS from Neutralisation by an Extract
of Thyroid Gland.
J. Clin. Endocr. 27, 173 (1967)
7. Adams, D.D. und T.H. Kennedy:
Evidence to Suggest that LATS Protector Stimulates
the Human Thyroid Gland.
J. Clin. Endocr. 33, 47 (1971)
8. Adams, D.D., T.H. Kennedy und R.D.H. Stewart:
Correlation Between Long-Acting Thyroid Stimulator
Protector Level and Thyroid ^{131}J Uptake in Thyro-
toxicosis.
Brit. Med. J. 2, 199 (1974)

9. Adams, D.D., F.N. Fastier, J.B. Howie, T.H. Kennedy,
J.A. Kilpatrick und R.D.H. Stewart:
Stimulation of the Human Thyroid by Infusions of
Plasma Containing LATS Protector.
J. Clin. Endocr. 39, 826 (1974)
10. Amino, N., K. Miyai, M. Azukizawa und Y. Kumahara:
Studies on the Interaction of Long-Acting Thyroid
Stimulator (LATS) with Soluble Thyroid Reactions.
Acta Endocr. 68, 625 (1971)
11. Arnaud, C.D., H.A. Kneubühler, V.L. Seiling,
B.K. Wightman und N.H. Engbring:
Responses of the Normal Human to Infusions of
Plasma from Patients with Graves'Disease.
J. Clin. Invest. 44, 1287 (1965)
12. Bashford, C.L., S.J. Harrison, G.K. Radda und
S.Q. Mehdi:
The Relation Between Lipid Mobility and the Specific
Hormon Binding of Thyroid Membranes.
Biochem. J. 146, 473 (1975)
13. Bastomsky, C. und J.M. McKenzie:
Interaction of thyrotropin on long-actin thyroid
stimulator with theophyllin.
Endocrinology 83, 309 (1968)
14. Beall, G.N. und D.H. Solomon:
On the Immunological Nature of the Long-Acting
Thyroid Stimulator.
J. Clin. Endocr. 26, 1382 (1966)
15. Beall, G.N. und D.H. Solomon:
Inhibition of Long-Acting Thyroid Stimulator by
Thyroid Particulate Fractions.
J. Clin. Investigation 45, 552 (1966)
16. Benhamon-Glynn, N., D.J. Elkabir, D. Doniach und
J.M. Roitt:
Inhibition of the Thyroid-Stimulating Globulin (LATS)
by particulate and Soluble Cell-Fractions.
Proc. Roy. Soc. med. 61, 1303 (1968)

17. Berumen, F.O., I.L. Lobszenz und R.D. Utiger:
Neutralisation of the long-acting thyroid stimu-
lator by thyroid subcellular fractions.
J. Lab. Clin. Med. 70, 640 (1967)
18. Bitensky, L., Alaghband-Zadeh und J. Chayen:
Studies on Thyroid Stimulating Hormones and
Long-Acting Thyroid Stimulating Hormone.
Clin. Endocr. 3, 363 (1974)
19. Brown, J., J. Ensor und D.S. Munro:
A Comparison of the Actions of Thyroid-Stimulating
Hormone and the Long-acting Thyroid Stimulator
in an in vitro Assay.
Proc. Roy. Soc. Med. 61, 652 (1968)
20. Burke, G.:
Comparison of Early Effects of Thyrotropin and
Long-Acting Thyroid Stimulator on Thyroidal
Phospholipogenesis.
Endocrinology 83, 1210 (1968)
21. Burke, G.:
The Cell Membrane: A Common Site of Action of
Thyrotropin (TSH) and Long-Acting Thyroid Stimu-
lator (LATS).
Metabolism 18, 720 (1969)
22. Burke, G.:
Comparative Effects of Thyrotropin and Long-acting
Thyroid Stimulator on Thyroidal Intermediary
Metabolism: Relationship to Pyridine Nucleotide
Levels.
Metabolism 18, 132 (1969)
23. Carneiro, L., K.J. Dorrington und D.S. Munro:
Recovery of the Long-Acting Thyroid Stimulator from
Serum of Patients with Thyrotoxicosis by Concentra-
tion of Immunoglobulin G.
Clin. Sci. 31, 215 (1966)

24. Chopra, I.J., D.H. Solomon und N.D. Limberg:
Specific and Nonspecific Responses in the
Bioassay of LATS.
J. Clin. Endocr. 31, 382 (1970)
25. Chopra, I.J., G.N. Beall und D.H. Solomon:
LATS Inhibition by a Soluble Lipoprotein from
Human Thyroid.
J. Clin. Endocr. 32, 772 (1971)
26. Dorrington, K.J., L. Carneiro und D.S. Munro:
Absorption of the Long-acting Thyroid Stimulator
by Human Thyroid Microsomes.
J. Endocr. 34, 133 (1966)
27. Erhardt, F.W., J. Marschner, R.C. Pickardt und
P.C. Scriba:
Verbesserung und Qualitätskontrolle der radio-
immunologischen TSH-Bestimmung.
Z. Klin. Chem. Biochem. 11, 381 (1973)
28. Geißler, D.:
Die Bestimmung thyreotroper Antikörper im
Radiologanden-Rezeptor-Versuch, Untersuchung zur
Pathogenese des Morbus Basedow.
Promotionsarbeit, Freie Universität Berlin (1976)
29. Hunter, W.M. und F.C. Greenwood:
A Radio-Immunoelectrophoretic Assay for Human
Growth Hormone.
Biochem. J. 91, 43 (1964).
30. Kaneko, T., U. Zor und J.B. Field:
Stimulation of Thyroid Adenyl Cyclase Activity and
Cyclic Adenosin 3',5'-Monophosphate by Long-acting
Thyroid Stimulator.
Metabolism. 19, 430 (1970)
31. Kendall-Taylor, P.:
Effects of Long-acting Thyroid Stimulator (LATS) and
LATS Protector on Human Thyroid Adenyl Cyclase
Activity.
Brit. Med. J. 3, 72 (1973)

32. Kendall-Taylor, P., S.M. Dirmikis und D.S. Munro:
Long-acting Thyroid Stimulators and Related Factors.
Proc. Roy. Soc. Med. 68, 252 (1975)
33. Kriss, J.P., V. Pleshakov und J.R. Chien:
Isolation and Identification of the LATS and Its
Relation to Hyperthyroidism and Circumscribed
Pretibial Myxedema.
J. Clin. Endocr. 24, 1005 (1964)
34. Kriss, J.P., V. Pleshakov, A.L. Rosenblum, M. Holderness,
G. Sharp und R. Utiger:
Studies on the Pathogenesis of the Ophthalmopathy
of Graves' Disease.
J. Clin. Endocr. 27, 582 (1967)
35. Kriss, J.P.:
Inactivation of Long-Acting Thyroid Stimulator (LATS)
by Anti-kappa and Anti-lambda Antisera.
J. Clin. Endocrin. 28, 1440 (1968)
36. Kotulla, P., E. Aulbert, H. Meinhold, F. Aldkofer,
K.W. Wenzel, H. Schleusener, I. Kruck und G. Kruck:
Methodological Approaches to Measuring Thyroid
Stimulating Factors with a Radioligand Receptor
Assay. in: Biochemical Basis of Thyroid Stimulation
and Thyroid Hormone Action, eds. A.v.z.Mühlen and
H. Schleusener; G. Thieme, Stuttgart, 62 (1976)
37. Lamki, L., V.V. Row und R. Volpé:
Cell-Mediated Immunity in Graves' Disease and in
Hashimoto's Thyroiditis as Shown by the Demonstra-
tion of Migration Inhibition Factor (MIF).
J. Clin. Endocr. 36, 358 (1973)
38. Levey, G.S. und I. Pastan:
Activation of thyroid adenylcyclase by long-acting
thyroid stimulator.
Life Science, Part I, 9, 67 (1970)

39. Lipman, L.M., D.E. Green, N.J. Synder, J.C. Nelson und D.H. Solomon:
Relationship of Long-Acting Thyroid Stimulator to the Clinical Features and Course of Graves' Disease.
Amer. J. Med. 43, 486 (1967)
40. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall:
Protein Measurement with Folin Phenol Reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
41. Manley, S.W. J.R. Bourke und R.H. Hawker:
The Thyrotropin Receptor in Guinea-Pig Thyroid Homogenate: General Properties.
J. Endocr. 61, 419 (1974)
42. McKenzie, J.M.:
Delayed thyroid response to serum from thyrotoxic patients.
Endocrinology 62, 865 (1958)
43. McKenzie, J.M.:
The Bioassay of Thyrotropin in Serum.
Endocrinology 63, 372 (1958)
44. McKenzie, J.M.:
Studies on the thyroid activator of hyperthyroidism.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 21, 635 (1961)
45. McKenzie, J.M.:
Pathogenesis of Graves' Disease: Role of the Long-acting Thyroid Stimulator.
J. Clin. Endocr. 25, 424 (1965)
46. McKenzie, J.M. und J. Gordon:
The Origin of the Long-acting Thyroid Stimulator, in: Cassano, C. und Andreoli (eds.):
"Current Topics in Thyroid Research".
Academic Press, New York, 445 (1965)

47. McKenzie, J.M.:
Experimental Production of a Thyroid Stimulating
Antithyroid Antibody.
J. Clin. Endocr. 28, 596 (1968)
48. McKenzie, J.M. und A. Williamson:
Experience with the Bio-assay of the LATS.
J. Clin. Endocr. 26, 518 (1966)
49. McKenzie, J.M.:
Humoral Factors in the Pathogenesis of
Graves' Disease.
Physiol. Rev. 48, 252 (1968)
50. McKenzie, J.M.:
Does LATS cause hyperthyroidism in Graves'
Disease.
Metabolism 21, 883 (1972)
51. McKenzie, J.M. und M. Zakarija:
A Reconsideration of a Thyroid-Stimulating Immuno-
globulin as the Cause of Hyperthyroidism in Graves'
Disease.
J. Clin. Endocr. 42, 778 (1976)
52. Mehdi, S.Q., T.D.R. Hockaday, and D.J. ElKabir:
LATS Actions on Bacterial Permeability and
Protein Synthesis.
Prov. roy. Soc. Med. 64, 1268 (1971)
53. Mehdi, S.Q., S.S. Nussey, C.P. Gibbons und D.J. ElKabir:
Binding of Thyroid Stimulators to Human Thyroid
Membranes.
Biochem. Soc. Transactions 1, 1005 (1973)
54. Mehdi, S.Q. und S.S. Nussey:
A Radio-Ligand Receptor Assay for the Long-Acting
Thyroid Stimulator - Inhibition by the Long-
Acting Thyroid Stimulator of the Binding of
Radioiodinated Thyroid-Stimulating Hormone to
Human Thyroid Membranes.
Biochem. J. 145, 105 (1975)

55. Miyai, K., M. Fukuchi, Y. Kumahara und H. Abe:
LATS Production by Lymphocyte Culture in Patients
with Graves'Disease.
J. Clin. Endocr. 27, 855 (1967)
56. Moore, W.V. und J. Wolff:
Thyroid-Stimulating Hormone Binding to Beef
Thyroid Membranes.
J. Biol. Chem. 249, 6255 (1974)
57. Mukhtar, E.D., B.R. Smith, G.A. Pyle, R. Hall und P. Vice:
Relation of Thyroid-Stimulating Immunoglobulins to
Thyroid Function and Effects of Surgery, Radioiodine
and Antithyroid Drugs.
Lancet 1, 7909, 713 (1975)
58. Munro, R.E., L. Lamki, V.V. Row und R. Volpé:
Cell-Mediated Immunity in the Exophtalmos of
Graves'Disease as Demonstrated by the Migration
Inhibition Factor Test.
J. Clin. Endocr. 37, 286 (1973)
59. Nussay, S.S.:
Biochemical Studies on the Mode of Action of
Thyroid Stimulators.
Promotionsarbeit, Oxford p. 53, 57 (1975)
60. Onaya, T., M. Kotania, T. Yamada und Y. Ochi:
New in vitro tests to detect the thyroid stimu-
lator in sera from hyperthyroid patients by
measuring colloid droplet formation and cyclic
AMP in human Thyroid slices.
J. Clin. Endocr. 36, 859 (1973)
61. Orgiazzi, J., D.E. Williams, I.J. Chopra und D.H.Solomon:
Evidence for normal thyroid adenyl cyclase, cyclic
AMP-binding and proteinkinase activities in
Graves'Disease.
J. Clin. Endocr. 40, 248 (1975)
62. Orgiazzi, J., D.E. Williams, I.J. Chopra und D.H.Solomon:
Human Thyroid Adenyl Cyclase-Stimulating Activity
in Immunoglobulin G of Patients with Graves'
Disease.
J. Clin. Endocr. 42, 341 (1976)

63. Pastan, I., J. Roth und V. Macchia:
Binding of Hormone to Tissue - The First Step in
Polypeptide Hormone Action.
Proc. Nat. Acad. Sci. 56, 1802 (1966)
64. Pinchera, A., M.G. Pinchera und J.B. Stanbury:
Thyrotropin and Long-Acting Thyroid Stimulator
Assays in Thyroid Disease.
J. Clin. Endocr. 25, 189 (1965)
65. Shishiba, Y., D.H. Solomon und G.N. Beall:
Cormparison of early effects of thyrotropin and
long-acting thyroid stimulator on thyroid secretion.
Endocrinology 80, 957 (1967)
66. Shishiba, Y., T. Shimizu, S. Yoshimura und K. Shizume:
Direct Evidence for Human Thyroidal Stimulation
by LATS-Protector.
J. Clin. Endocr. 36, 517 (1973)
67. Smith, B.R., D.S. Munro und K.J. Dorrington:
The Distribution of the Long-Acting Thyroid Stimu-
lator Among γ G-Immunoglobulins.
Biochem. Biophys. Acta 188, 89 (1969)
68. Smith, B.R.:
The Interaction of Long-Acting Thyroid Stimulator
(LATS) with Thyroid Tissue in vitro.
J. Endocr. 46, 45 (1970)
69. Smith, B.R. und R. Hall:
Thyroid-Stimulating Immunoglobulins in Graves'
Disease.
Lancet 2/7878, 427 (1974)
70. Smith, B.R. und R. Hall:
Binding of Thyroid Stimulators to Thyroid
Membranes.
FEBS Letters 42, 301 (1974)
71. Solomon, D.H. und G.N. Beall:
Thyroid-Stimulating Activity in the Serum of
Immunized Rabbit Nature of Thyroid-Stimulating
Material.
J. Clin. Endocr. 28, 1496 (1968)

72. Schell-Frederick, E. und J.E. Dumont:
Mechanism of Action of Thyrotropin. in: Litwack Ed,
Biochemical Actions of Hormones 1, 415 (1970)
73. Schleusener, H.:
The Long-Acting Thyroid Stimulator:
Untersuchungen zur Pathogenese des Morbus Basedow.
Habilitationsschrift (1970)
74. Schleusener, H., P.V.N.Murthey und J.M.McKenzie:
Studies on the thyroid gland component inhibiting
LATS.
Metabolism 20, 299 (1971)
75. Schleusener, H., P. Kotulla, I. Kruck, G. Kruck,
D. Geißler und F. Adlkofer:
Comparison and Evaluation of the Radio-Ligand-
Receptor Assay and the Mouse Bioassay for the
Detection of Human Thyroid Stimulating Immunoglo-
bulins.
in: Thyroid Research, eds. J. Robbins, L.E.Braverman,
Excerpta Medica Amsterdam, 414 (1976)
76. Schleusener, H.:
Thyroid Stimulating Immunoglobulins in Graves'
Disease.
in: Regulation of Thyroid Function, eds.: J. Klein
und D. Reinwein, Schattauer Verlag, 159 (1977)
77. Volpé, R., M. Edmonds, L. Lamki, P.V. Clarke und
V.V. Row:
The Pathogenesis of Graves' Disease: A Disorder
of Delayed Hypersensitivity?
Mayo Clin. Proc. 47, 824 (1972)
78. Volpé, R., N.R. Farid, C. von Westarp und V.V.Row:
The Pathogenesis of Graves' Disease and Hashimoto's
Thyroiditis.
Clin. Endocrinology 3, 239 (1974)

79. Wall, J.R., B.F. Good, I.J. Forbes und B.S. Hetzel:
Demonstration of the production of the LATS by
peripheral Lymphocytes cultured in vitro.
Clin. exp. Immunol. 14, 555 (1973)
80. Werner, S.C.:
Immun method of thyrotropin assay.
in Thyrotropin, edited by S.C. Werner,
Springfield, III: Thomas, 301 (1963)
81. Weir, D.M.:
Salt Fractionation of Immunoglobulins.
in: Handbook of Experimental Immunology.
Blackwell Scientific Publications, 1, p. 6.2,
18.8. (1973)
82. Wolff, J. und A.B. Jones:
The purification of bovine thyroid plasma membra-
nes and the properties of membrane-bound adenyl-
cyclase.
J. Biol. Chem. 246, 3939 (1971)
83. Wong, E.T. und G.W. Litman:
Interaction of purified Long-Acting Thyroid
Stimulator (LATS) and Thyroid Microsomes in vitro.
J. Clin. Endocr. 29, 72 (1969)
84. Yamashita, K. und J.B. Field:
Effects of LATS on Thyrotropin Stimulation of
Adenyl Cyclase Activity in Thyroid Plasma
Membranes.
J. Clin. Invest. 51, 463 (1972)
85. Zakarija, M. und J.M. McKenzie:
Effect of Thyrotropin and of Long-acting Thyroid
Stimulator on Mouse Thyroid Cyclic AMP.
Metab. 22, 1185 (1973)

Lebenslauf

Am 4. Juli 1947 wurde ich, Gerhard Kruck, als fünftes Kind des Landwirts Edmund Kruck und seiner Ehefrau Martha geb. Betz auf dem Klumpenhof bei Neuenstein in Baden Württemberg geboren.

1954 trat ich in Neuenstein in die Grundschule ein und besuchte ab 1958 das Hohenlohegymnasium in Öhringen.

1962 wechselte ich an das evangelisch-kirchliche Aufbaugymnasium in Michelbach/Bilz, wo ich 1967 die Reifeprüfung ablegte. Nach einem Semester Schulmusik an der Musikhochschule in Stuttgart leistete ich an der Diakonissenanstalt in Schwäbisch Hall meinen Ersatzdienst.

Im Anschluß begann ich im Oktober 1969 mit dem Medizinstudium in Ulm/Donau. Nach der naturwissenschaftlichen Vorprüfung wechselte ich an die Universität Heidelberg. Im April 1971 heiratete ich Irmtraut Lang. Im Sommersemester 1972 legte ich in Heidelberg die ärztliche Vorprüfung ab. Nach einem Auslandssemester in Montpellier in Frankreich setzte ich das klinische Studium an der Freien Universität Berlin fort, das ich im Februar 1976 mit der ärztlichen Prüfung abschloß. Als Medizinalassistent war ich in Berlin am Klinikum Steglitz in der Inneren Medizin und in der Neurologischen Abteilung, am Städtischen Krankenhaus Am Urban in der Chirurgie tätig. Seit dem 1. Januar 1978 arbeite ich als Assistenzarzt am Städtischen Krankenhaus Zehlendorf, Bereich Heckeshorn.

Lebenslauf

Am 23. Mai 1949 wurde ich, Irmtraut Kruck geb. Lang, als viertes Kind des Dr. Wilhelm Lang und seiner Ehefrau Elfried geb. Reuther in Schwäbisch Hall geboren. Nach der Grundschule besuchte ich den neusprachlichen Zweig des Mädchengymnasiums im Haal in Schwäbisch Hall. 1966/1967 erhielt ich ein Stipendium des American-Field-Service nach den USA. 1969 legte ich am Mädchengymnasium im Haal die Reifeprüfung ab. Im Sommersemester 1970 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der Universität Hohenheim.

Seit dem 1. April 1971 bin ich mit Gerhard Kruck aus Neuenstein verheiratet. Nach der Naturwissenschaftlichen Vorprüfung wechselte ich an die Universität Heidelberg über bis zur Ärztlichen Vorprüfung. Nach einem einsemestrigen Auslandsaufenthalt an der Universität Montpellier setzte ich dann das Studium an der Freien Universität Berlin fort. Im Februar 1976 legte ich dann das Staatsexamen ab. Es schloß sich die Medizinalassistentenzeit am Klinikum Steglitz (Innere Medizin), Jüdisches Krankenhaus (Chirurgie) und Kinderklinik des Rudolf Virchow-Krankenhauses (Pädiatrie) an. Danach war ich vier Monate als Assistenzärztin an der Kinderklinik des Rudolf Virchow-Krankenhauses tätig und bin seit November 1977 wissenschaftliche Assistentin der Medizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin.

An dieser Stelle möchten wir Herrn Prof. Dr. H. Schleusener ganz herzlich für die Überlassung des Themas danken.

Weiterhin gilt unser Dank Herrn Dr. S. Q. Mehdi, der uns bei der Einarbeitung in das Thema sowohl praktisch als auch theoretisch half.

Unseren besonderen Dank möchten wir Herrn Dr. P. Kotulla aussprechen, der uns bei der Durchführung und Abfassung der Arbeit stets mit Rat und Tat zur Verfügung stand.

Auch bei allen Mitarbeitern im Labor Schleusener möchten wir uns für die Hilfe bedanken.

